

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**DIEGO CORREIA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PADRÃO BASAL DE ANSIEDADE  
SOBRE O EFEITO ANSIOLÍTICO E PADRÃO DE CONSUMO DE ÁLCOOL  
NUM MODELO DE ADIÇÃO EM CAMUNDONGOS**

**CURITIBA**

**2009**

**DIEGO CORREIA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PADRÃO BASAL DE ANSIEDADE  
SOBRE O EFEITO ANSIOLÍTICO E PADRÃO DE CONSUMO DE ÁLCOOL  
NUM MODELO DE ADIÇÃO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dra. Roseli Boerngen de Lacerda

**CURITIBA**

**2009**

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais pela força, amor e compreensão.

A prof. Dra. Roseli Boerngen de Lacerda pela orientação, apoio e exemplo.

A todos os professores, funcionários e amigos da farmacologia.

A Andrea Frozino e aos estagiários da medicina sem os quais esse trabalho não seria possível.

Aos irmãos Gué, Mateus, Marco e Max.

As irmãs Lya, Gi e Dé.

***“Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da  
ignorância que podemos solucioná-los.”***

***Isaac Asimov***

**Nota Explicativa:**

Dissertação apresentada em formato alternativo – artigos para publicação – conforme aceito pelas normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 Epidemiologia do uso abusivo e da dependência do uso de drogas.....	13
1.2 Neurobiologia da Adição.....	15
1.3 Mecanismo de ação do Etanol.....	23
1.4 Modelos animais em psicofarmacologia.....	25
1.5 Modelos Animais de Dependência/ Adição.....	26
1.5.1 Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Positivas.....	27
1.5.2 Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Negativas.....	29
1.5.3 Modelos de Adição: Procura à Droga, Uso Compulsivo e Recaída.....	30
1.6. Ansiedade.....	33
1.6.1 Definição e conceitos.....	33
1.6.2 Classificação dos transtornos de ansiedade.....	34
1.7. Neurobiologia da ansiedade.....	37
1.7.1. Reações de defesa.....	37
1.7.2. Sistema de aproximação comportamental.....	39
1.7.3. Sistema cerebral de defesa.....	39
1.7.4. Sistema de inibição comportamental.....	42
1.7.5 Integração dos três sistemas.....	43
1.8. Modelos animais de ansiedade.....	45
1.8.1 Modelos não condicionados.....	45
1.8.1.1 Teste do campo aberto “Open field”.....	45
1.8.1.2 Teste da placa com furos “Holeboard”.....	45
1.8.1.3 Caixa de transição claro-escuro.....	46
1.8.1.4 Interação social.....	46
1.8.1.5 Agressão induzida por isolamento.....	46
1.8.1.6 Teste de neofagia.....	46

1.8.1.7	<i>Teste da escada “Staircase”</i> .....	47
1.8.1.8	<i>Labirinto em cruz elevado</i> .....	47
1.8.2	<i>Modelos condicionados</i> .....	48
1.8.2.1	<i>Teste das quatro placas</i> .....	48
1.8.2.2	<i>Sobressalto potencializado pelo medo</i> .....	49
1.8.2.3	<i>Teste de conflito de Vogel</i> .....	49
1.9	<b>Relação entre etanol e ansiedade em humanos</b> .....	51
2.0	<b>OBJETIVOS</b> .....	58
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	58
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	58
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	58
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	59
4.1	<b>Animais</b> .....	59
4.2	<b>Equipamentos</b> .....	59
4.2.1	<i>Caixa de Movimentação Espontânea</i> .....	59
4.2.2	<i>Labirinto em Cruz Elevado</i> .....	59
4.2.3	<i>Campo Aberto</i> .....	60
4.3	<b>Drogas</b> .....	60
4.4	<b>Procedimento</b> .....	62
4.4.1	<i>Experimento 1</i> .....	62
4.4.2	<i>Experimento 2</i> .....	63
4.4.3	<i>Experimento 3</i> .....	64
4.4.4	<i>Cálculo da quantidade de álcool consumido em gramas/Kg/dia</i> .....	65
4.5	<b>Análise Estatística</b> .....	66
5	<b>RESULTADOS - ARTIGO</b> .....	68
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	103
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	104
	<b>APÊNDICE 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS</b> .....	125
	<b>APÊNDICE 2 – DADOS COMPORTAMENTAIS</b> .....	129

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Esquema simplificado das ações agudas das drogas de abuso na via VTA-NAcc.....	18
<b>Figura 02.</b> Alguns eventos celulares envolvidos na regulação do CREB.....	19
<b>Figura 03.</b> Circuitos cerebrais recrutados em diferentes estágios do ciclo da adição enquanto a adição vai do reforço positivo para o reforço negativo.....	22
<b>Figura 04.</b> Representação esquemática da organização das estruturas envolvidas na integração e indução de estados ansiosos.....	42
<b>Figura 05.</b> Sistema de inibição comportamental.....	43
<b>Figura 06.</b> Relação entre estímulo, sistema luta/fuga/congelamento (FFFS), sistema de aproximação comportamental (BAS) e o sistema de inibição comportamental (BIS).....	44
<b>Figura 07.</b> Modelos animais de ansiedade.....	50
<b>Figura 08.</b> Caixa de movimentação espontânea.....	61
<b>Figura 09.</b> Labirinto em cruz elevado.....	61
<b>Figura 10.</b> Campo Aberto.....	62
<b>Figura 11.</b> Procedimento geral do experimento 1.....	63
<b>Figura 12:</b> Procedimento geral do experimento 2.....	64
<b>Figura 13.</b> Procedimento geral do experimento 3.....	66
<i>Figuras do artigo:</i>	
<b>Figure 1</b> – Effect of ethanol on anxiety behavior in elevated plus-maze in mice with different basal anxiety levels.....	80
<b>Figure 2</b> - Preference for ethanol during different phases of the self-administration model.....	81
<b>Figure 3</b> – Correlations between anxiety indices and ethanol consumption.....	82
<b>Figure 4</b> – Anxiety behavior evaluated in three occasions in plus-maze in groups with different ethanol intake pattern and different anxiety basal levels. ....	83



## LISTA DE ABREVIATURAS

**%OT** – percentual de tempo no braço aberto  
**AMP** - monofosfato de adenosina  
**AMPC** - monofosfato de adenosina cíclico  
**ATV** – área tegmental ventral  
**BDNF** - fator neurotrófico derivado do cérebro  
**BNST**- núcleo do leito da estria terminal  
**CaM** - calmodulina  
**CRE** – elementos responsáveis ao AMPC  
**CREB** - proteína ligante ao elemento responsivo ao AMP cíclico  
**CRF** – fator de liberação de corticotrofina  
**DNA** – ácido desoxirribonucleico  
**DA** - dopamina  
**GABA** – ácido gama aminobutírico  
**GluR1Rs** - subunidade GluR1 do receptor AMPA  
**HA** – alta ansiedade  
**HM** – hipotálamo medial  
**MA** – média ansiedade  
**MAPK** – proteína quinase ativada por mitógeno  
**MCP** – matéria cinzenta periaquedutal  
**MCPD** – matéria cinzenta periaquedutal dorsal  
**NA** – baixa ansiedade  
**NMDA** – n-metil d-aspartato  
**NP** - non-preferring  
**NAcc** – núcleo accumbens  
**P** - preferring  
**PDE** - fosfodiesterase  
**PLC** - fosfolipase  
**SAC** – sistema de aproximação comportamental  
**SCD** – sistema cerebral de defesa  
**SIC** – sistema de inibição comportamental  
**Sp** - Sardinian preferring  
**sNP** - Sardinian non-preferring  
**TrkB** - receptor tirosina quinase de neurotrofinas tipo 2  
**TRT** - teoria redutora da ansiedade ou tensão

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PADRÃO BASAL DE ANSIEDADE  
SOBRE O EFEITO ANSIOLÍTICO E PADRÃO DE CONSUMO DE ÁLCOOL  
NUM MODELO DE ADIÇÃO EM CAMUNDONGOS**

Autores:

Diego Correia. Aluno de Mestrado em Farmacologia. <sup>1</sup>

Roseli Boerngen de Lacerda. Professora Dra. em Ciências  
(Psicobiologia).

1. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia.

Endereço: Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba – PR

Caixa Postal: 190-31 CEP: 81531-980

E-mail do responsável: [diegocorreia@ufpr.br](mailto:diegocorreia@ufpr.br)

## RESUMO

Existe a proposta que a ansiedade tem um papel na adição ao etanol, mas o mecanismo pelo qual isso ocorreria permanece não esclarecido. Esse estudo teve como objetivo averiguar a relação entre níveis basais de ansiedade, o efeito ansiolítico do etanol e o consumo de etanol em camundongos expostos a um modelo de adição. No experimento 1, 300 camundongos Swiss foram caracterizados como alta ansiedade (HA), ansiedade media (MA), ou não ansiosos (NA) de acordo com seu percentual de tempo no braço aberto (%OT) no labirinto em cruz elevado. Os animais foram então separados em dois grupos, um recebendo salina i.p. e outro etanol 2 g/kg diariamente ( $n = 15-17$ /tratamento e subgrupo de nível de ansiedade). E foram testados novamente em uma administração aguda, sete dias após o basal, e após 15 e 29 dias da administração crônica. Camundongos NA tiveram uma diminuição %OT com o passar dos testes, independentemente do tratamento que recebiam. Camundongos MA, tratados com salina ou etanol, mantiveram os valores de %OT. Apenas os animais HA tiveram um efeito ansiolítico do etanol, tanto agudamente como após 29 dias de tratamento. Os animais HA tratados com salina mantiveram seu %OT no decorrer do experimento. No experimento 2 foram usados inicialmente 200 camundongos Swiss e foram caracterizados 37 HA e 96 MA de acordo com critérios similares aos do experimento 1, com a exceção que os animais foram expostos 2 vezes ao labirinto em cruz elevado com um intervalo de 7 dias. Camundongos HA e MA ( $n = 29$  e  $n = 30$ /grupo, respectivamente) foram isolados e expostos um paradigma de livre escolha entre soluções de etanol (5% e 10%) e água e que consisti em quatro fases: aquisição (AC, 10 semanas), abstinência (W, 2 semanas), reexposição (RE, 2 semanas), e adulteração com quinino (AD, 2 semanas). Camundongos controle HA e MA ( $n = 8$  e  $n = 10$ /grupo, respectivamente) tiveram acesso apenas a água. Os animais foram caracterizados como adictos (preferência por etanol e sem redução durante a adulteração do etanol), bebedor pesado (preferência [por etanol com redução na fase de adulteração], e bebedor leve.(preferência por água). Não foi observada diferenças entre os camundongos HA e MA com relação a sua preferência pelo etanol ou no seu padrão de consumo. Não foi observada correlação entre o consumo de etanol e o %OT medido tanto nos testes basais como no teste durante a abstinência. A diferença no %OT entre os grupos HA e MA persistiu no teste realizado com 5H de abstinência, sugerindo que os grupos tinham um perfil de ansiedade do tipo 'traço'. Os dados sugerem que apesar de altos níveis de ansiedade serem importantes para o efeito ansiolítico do etanol, isso não é um fator determinante para o alto consumo de etanol, pelo menos nessas condições experimentais.

**Palavras chave:** Etanol; Ansiedade de traço; Labirinto em cruz elevado; Modelo de adição; Camundongo.

## ABSTRACT

Anxiety has been proposed to play a role in the development of alcohol addiction, but the exact mechanisms by which this occurs remain unclear. The present study aimed to verify the relationship between basal anxiety levels, the anxiolytic-like effect of ethanol, and ethanol intake in mice exposed to an addiction model. In Experiment 1, 300 Swiss mice were characterized as high-anxiety (HA), medium-anxiety (MA), or non-anxiety (NA) according to their percent open arm time (%OT) in the elevated plus maze. The mice were then assigned to receive daily i.p. saline or ethanol 2 g/kg ( $n = 15-17/\text{treatment and anxiety level subgroup}$ ) and were again exposed to the same test under the same conditions (i.e., acute administration, 7 days after the drug-free test; after 15 and 29 days of chronic administration). NA mice exhibited decreased %OT over the test days, regardless of treatment. MA mice, saline- or ethanol-treated, maintained %OT values over test days. Only HA mice showed an anxiolytic-like effect of ethanol, both acutely and after 29-day treatment. The HA saline-treated mice maintained their %OT over test days. In Experiment 2 using 200 drug-free Swiss mice, 37 HA and 96 MA mice were characterized using criteria similar to Experiment 1, with the exception that mice were exposed twice to the elevated plus maze with a 7-day interval. HA and MA mice ( $n = 29$  and  $n = 30/\text{group}$ , respectively) were individually housed and were offered oral ethanol (5% and 10%) and water in a free-choice paradigm consisting of four phases: acquisition (AC, 10 weeks), withdrawal (W, 2 weeks), reexposure (RE, 2 weeks), and quinine-adulteration (AD, 2 weeks). HA and MA control mice ( $n = 8$  and  $n = 10/\text{group}$ , respectively) had access only to water. Mice were characterized as addicted (preference for ethanol and no reduction in ethanol intake when adulterated), heavy-drinker (preference for ethanol but with a reduction in AD), and light-drinker (preference for water during all phases). No difference was observed between HA and MA mice in their preference for ethanol and their intake pattern. No correlation was observed between ethanol intake during any phase or %OT measured both in the basal tests and during the W phase. The differences in %OT between HA and MA groups persisted in the elevated plus maze performed 5 h after ethanol withdrawal, suggesting that these groups had a “trait” anxiety profile. The data suggest that despite the fact that high anxiety trait levels are important for the anxiolytic-like effects of ethanol, they are not a determining factor for high ethanol intake, at least not under these experimental conditions.

**Keywords:** Ethanol; Trait anxiety; Elevated plus-maze; Addiction model; Mice.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. EPIDEMIOLOGIA DO USO ABUSIVO E DA DEPENDÊNCIA DE DROGAS DE ABUSO

O uso de drogas psicoativas (com ação sobre o sistema nervoso central) remonta aos ancestrais dos homens. Seja pelo seu uso em rituais religiosos, como medicamento ou simplesmente pelo prazer que podem propiciar ao usuário. Durante a história, esse uso passou por períodos de aceitação e de total proibição, sendo por isso que algumas drogas são aceitas em determinadas culturas e em outras são utilizadas somente na clandestinidade (SILVEIRA; MOREIRA, 2006).

No Brasil e no mundo o uso de drogas psicoativas é muito alto. Nas tabelas 1 e 2 abaixo podem ser vistos os percentuais de uso e dependência das principais drogas de abuso no Brasil. A prevalência de uso na vida de qualquer droga, exceto tabaco e álcool, foi maior na região Nordeste, onde alcançou 27,6%. A região com menos uso na vida foi a Norte com 14,4%. Considerando-se o país como um todo, a taxa foi de 22,8% da população. O menor uso na vida de álcool ocorreu na Região Norte (53,9%) e o maior na Sudeste (80,4%). Ainda, são observados mais dependentes de álcool para o sexo masculino (CARLINI *et al*, 2007).

O departamento americano de saúde estima que em 2004 9,4% da população americana acima dos 12 anos apresentava uso abusivo ou aditivo de alguma substância. Esses comportamentos levam a prejuízos no sistema de saúde, comportamentos criminosos, direção negligente, perda de emprego e diversas outras formas de diminuição da produtividade desses indivíduos (CHOU; NARASIMNHAN, 2005).

O abuso no consumo de álcool e a sua dependência são problemas que afetam mais de 25 milhões de brasileiros e representam um dos maiores problemas de saúde pública tanto no Brasil como no resto do mundo (CARLINI *et al*, 2007). Além disso, os problemas decorrentes direta e indiretamente do consumo de álcool, como acidentes, violência e perda de produtividade, geram grandes prejuízos econômicos (WHO, 2002).

DROGAS	TIPOS DE USO %		
	Navida	Noano	Nomês
MACONHA	8,8	2,6	1,9
SOLVENTES	6,1	1,2	0,4
BENZODIAZEPÍNICOS	5,6	2,1	1,3
OREXÍGENOS	4,1	3,8	0,1
ESTIMULANTES	3,2	0,7	0,3
COCAÍNA	2,9	0,7	0,4
XAROPES (codeína)	1,9	0,4	0,2
OPIÁCEOS	1,3	0,5	0,3
ALUCINÓGENOS	1,1	0,32	0,2
ESTERÓIDES	0,9	0,2	0,1
CRACK	0,7	0,1	0,1
BARBITÚRICOS	0,7	0,2	0,1
ANTICOLINÉRGICOS	0,5	0	0
MERLA	0,2	0	0
HEROÍNA	0,1	0	0
ÁLCOOL	74,6	49,8	38,3
TABACO	44,0	19,2	18,4

Tabela 1- Distribuição dos 7.939 entrevistados, segundo uso na vida, uso no ano e uso no mês das drogas mais comuns em 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes. FONTE: CARLINI et al, 2007.

DEPENDÊNCIA	
% de dependentes:	
DROGAS	2005
ÁLCOOL	12,3
TABACO	10,1
MACONHA	1,2
BENZODIAZEPÍNICOS	0,5
SOLVENTES	0,2
ESTIMULANTES	0,2

Tabela 2- Distribuição dos 7.939 entrevistados, segundo dependência de drogas, em 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes. FONTE: CARLINI et al, 2007.

O álcool é a substância psicoativa de maior uso no Brasil. Vários fatores influenciam para isso, principalmente: o fato de ser uma droga lícita, socialmente aceita e muitas vezes ter seu uso incentivado pela sociedade no que se pode chamar de “ritos de passagem” como por exemplo a primeira intoxicação do adolescente, além de ter fácil acesso e baixo preço e deficiência na fiscalização (venda para menores de idade, por exemplo), entre outros.

O álcool leva a diversas complicações clínicas decorrentes do seu uso. Tendo efeitos deletérios sobre o trato gastrointestinal, sistema nervoso, sistema cardiovascular, sistema hematológico, sistema reprodutor e função sexual. Pode também levar a complicações psiquiátricas (quadros psicóticos, depressão, síndrome de abstinência, síndromes demenciais, distúrbios de ansiedade, entre outras) e a Síndrome Fetal Alcoólica, quando consumido em grandes quantidades por gestantes (SILVEIRA; MOREIRA, 2006). O termo Síndrome Fetal Alcoólica foi introduzido por Jones e Smith em 1973. Essa síndrome é caracterizada por anomalias craniofaciais características (Ex.: fissura palpebral curta, lábio superior achatado, nariz curto, pequena circunferência da cabeça, pequena abertura dos olhos), retardo de crescimento pré e pós natal e desenvolvimento anormal do sistema nervoso central (Ex.: tamanho da cabeça pequeno ao nascer, prejuízo em funções motoras finas, anormalidades estruturais do cérebro como microcefalia). Existe também a Síndrome dos Efeitos do Álcool onde apenas alguns dos critérios para a síndrome alcoólica fetal são preenchidos. (WARREN; FOU DIN, 2001)

## **1.2 NEUROBIOLOGIA DA ADIÇÃO**

Entre as drogas psicoativas algumas possuem propriedades reforçadoras, sendo então chamadas de drogas psicotrópicas. Reforço ou estímulo reforçador é a capacidade que a droga tem de criar e manter hábitos e comportamentos. Essa característica é considerada fundamental para que a droga seja capaz de induzir dependência. O reforço pode ser positivo ou negativo. Reforço positivo é a capacidade da droga de produzir efeitos agradáveis e sensações prazerosas. Reforço negativo é a capacidade da droga de diminuir sensações desagradáveis. Em muitos casos é difícil separar qual o tipo de reforço predominante em determinada situação (ALMEIDA, 2006). Por exemplo, o etanol apresenta reforço positivo pela sua capacidade de produzir euforia e reforço negativo pelo seu efeito ansiolítico e por evitar a síndrome de abstinência.

Essas drogas com propriedade reforçadora, por induzirem a auto administração, podem levar a estados de uso abusivo, dependência e adição. O termo adição é usado no DSM-IV (APA, 1994) preferencialmente ao termo

dependência para evitar confusão com o termo dependência física. Dependência física se refere às adaptações que levam a sintomas de abstinência na interrupção abrupta do uso de uma droga, que recebe a denominação de Síndrome de Abstinência. Essas adaptações são diferentes das adaptações que ocorrem na adição, na qual a principal característica é a perda de controle sobre o uso da droga, mesmo sob consequências adversas intensas (VOLKOW; LI, 2005). No padrão de comportamento abusivo, existem, de forma recorrente e significativa, consequências negativas do uso da droga, mas ainda não existe a presença de tolerância, síndrome de abstinência e perda do controle sobre o uso da droga (KAPLAN; SADOCK, 1995).

A progressão do uso inicial à adição é influenciada por muitos fatores. Entre eles a droga em si, a personalidade do usuário, e influências de outras pessoas e ambientais. A interação entre esses fatores é complexa e determina porque alguns indivíduos apresentam comportamentos aditivos e outros não. O uso inicial da droga pode ser voluntário, na busca de prazer, das suas propriedades reforçadoras, mas para a pessoa que apresenta adição a escolha pelo uso da droga não é mais voluntária. Ocorre uma neuroadaptação semelhante ao que ocorre no aprendizado de uma tarefa e o indivíduo procura a droga mesmo na evidencia de consequências pessoais negativas e graves (CHOU; NARASIMNHAN, 2005). No entanto, os mecanismos neurobiológicos que determinam essa transição do uso controlado para o descontrolado ainda não estão totalmente esclarecidos. As recaídas no uso das drogas é o fator clínico mais difícil de ser controlado no tratamento da adição. Após longo período de abstinência o *craving* (desejo compulsivo) pela droga ou a recaída pode ser iniciado pela presença da droga em si, por pistas ambientais que estejam associadas à droga ou pelo estresse (SHAHAN; HOPE, 2005).

As drogas de abuso são substâncias com diversas estruturas químicas e mecanismos de ação. Na administração aguda cada droga se liga a um sítio de ação próprio e desencadeia uma série de comportamentos, sensações e efeitos fisiológicos. Entretanto, no uso crônico, alguns efeitos são compartilhados pelas diferentes drogas de abuso. Essas drogas são todas agudamente recompensadoras (o que leva a repetição do seu uso), produzem sintomas emocionais negativos na sua abstinência, produzem um longo período de sensibilização comportamental e ocorre um aprendizado associativo

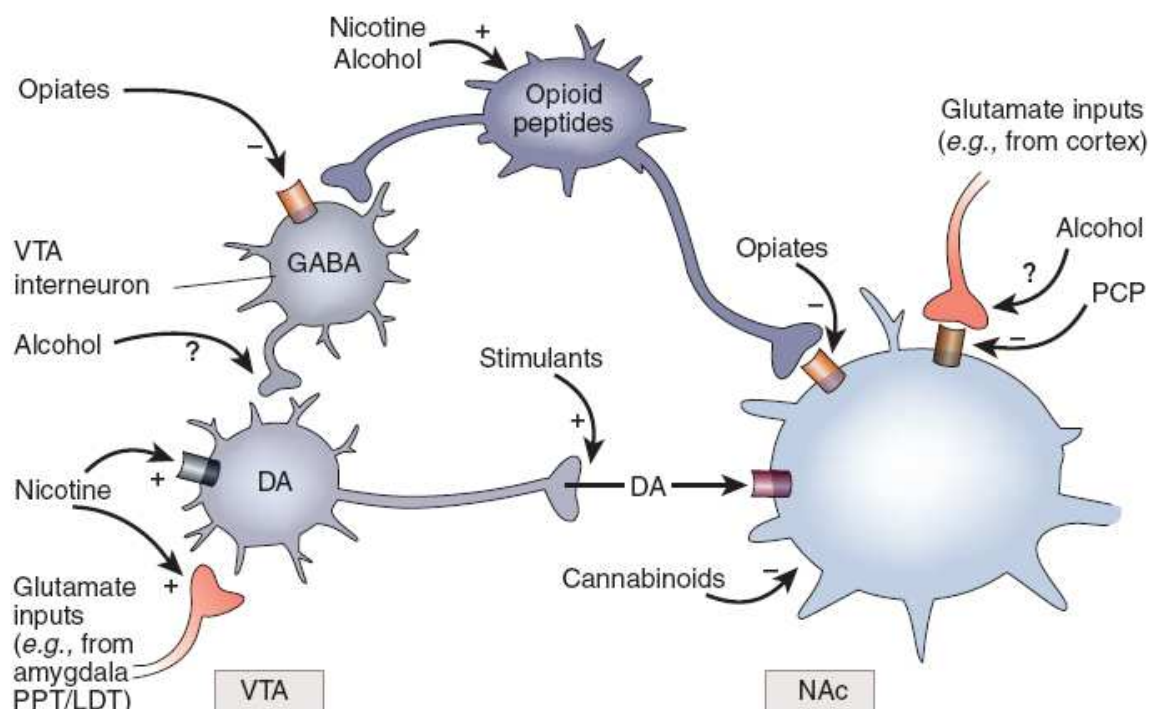


entre a droga e as pistas ambientais relacionadas a ela. Acredita-se que essas adaptações contribuam para o *craving* pela droga e pelas recaídas, mesmo após longos períodos de abstinência.

Existem várias evidências que todas as drogas de abuso convergem a um circuito comum no sistema límbico cerebral (Figura 1). A principal via que tem sido investigada é a via dopaminérgica que se inicia na área tegmental ventral (ATV) e vai em direção ao núcleo accumbens (NAcc). Esse circuito é o mais importante para os efeitos recompensadores agudos de todas as drogas de abuso, e várias pesquisas têm mostrado como, apesar de seus diferentes mecanismos de ação, todas as drogas convergem a essa via, tendo assim efeitos agudos reforçadores comuns. Drogas estimulantes (cocaína, anfetaminas) tem um mecanismo de ação direto sobre essa via, principalmente por inibirem a recaptação de dopamina e, no caso das anfetaminas, aumentarem a liberação de dopamina. Opióides inibem interneurônios gabaérgicos na ATV, levando à maior atividade dessa região. Os opióides também agem diretamente como agonistas dos receptores opióides, também encontrados em neurônios do NAcc, ativando a via da proteína Gi, de maneira semelhante ao que se observa na ativação do receptor D2 da dopamina. Nicotina parece ativar os neurônios da ATV diretamente via receptores nicotínicos e indiretamente pela ativação de neurônios glutamatérgicos que inervam as células dopaminérgicas. O álcool, pela ativação de receptores GABAA, inibe terminais gabaérgicos desinibindo os neurônios dopaminérgicos e também inibe terminais glutamatérgicos que inervam o núcleo accumbens. O álcool tem vários mecanismos propostos para sua ação, e é a droga que tem o mecanismo de ação menos conhecido. Os canabinóides parecem agir sobre receptores tipo 1 para canabinóides endógenos (CB1), que são acoplados à proteína Gi em terminais nervosos glutamatérgicos e gabaérgicos no NAcc e diretamente nos seus corpos neuroniais. Fenciclidina inibe receptores para o glutamato subtipo NMDA (N-metil D-aspartato) pós sinápticos no NAcc. Álcool e nicotina parecem ativar também as vias opióides e todas as drogas de abuso parecem ativar o sistema canabinóide endógeno (NESTLER, 2005).

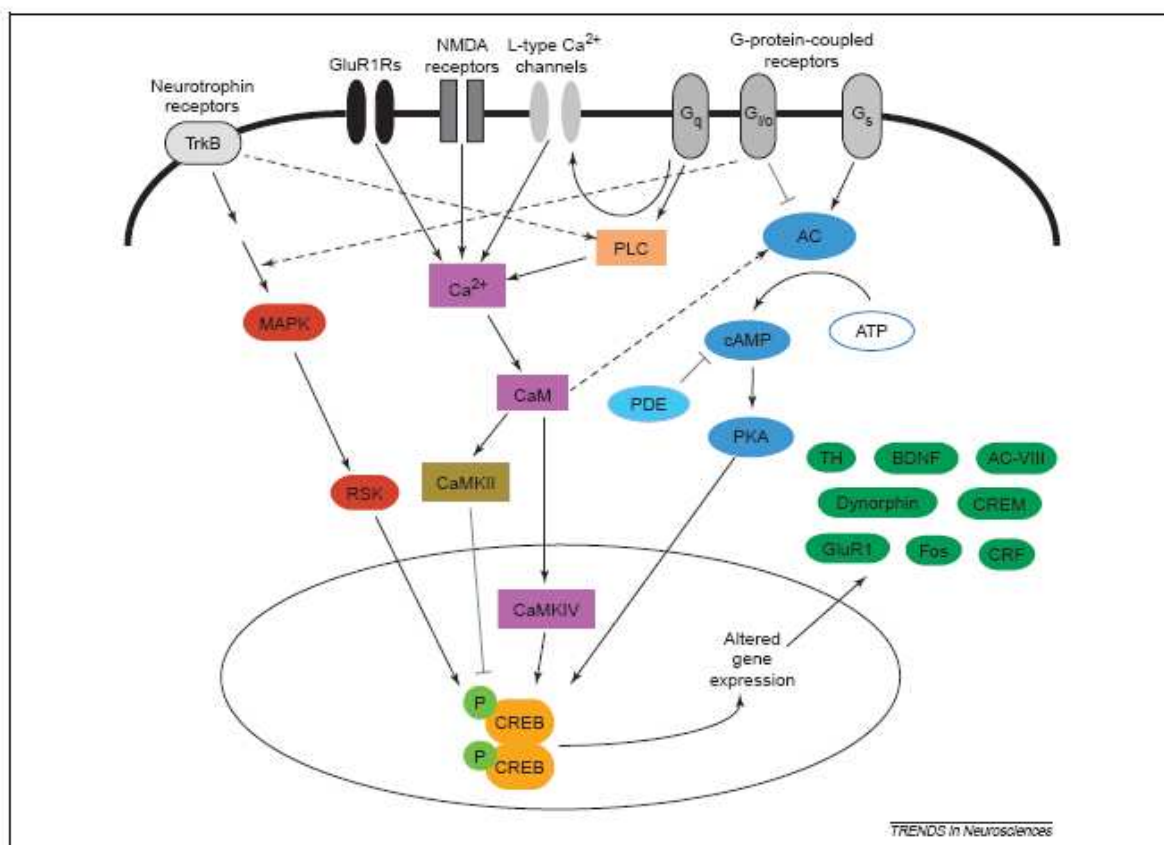
Essas ações agudas das drogas levam a alterações de membrana e citoplasmáticas que geralmente são locais e passageiras. Mas elas ativam

fatores de transcrição que possivelmente resultam em mudanças funcionais duradouras (KOOB; SANNA; BLOOM, 1998).



**Figura 1 – Esquema simplificado das ações agudas das drogas de abuso na via VTA-NAc.** PPT/LDT: tegmento pedúnculo pontino / tegmento dorso lateral; PCP: fenciclidina; DA: dopamina; VTA: área tegmental ventral; NAc: núcleo accumbens. Fonte: NESTLER, 2005

Um dos fatores de transcrição afetados pelo uso crônico de drogas é a proteína ligante ao elemento responsivo ao AMP cíclico (CREB) (figura 2). O CREB é expresso em todas as células do cérebro e é essencial em processos que se iniciam na membrana e levam a alteração na expressão gênica. Podendo assim alterar a função de neurônios individualmente ou de circuitos neuronais como um todo. Quando fosforilado (existem sítios de fosforilação variados e que regulam a sua atividade de forma diferente) pela proteína kinase A, por mensageiros intracelulares associados ao cálcio ou por kinases ativadas pela MAPK, o CREB se torna ativo. Quando ativo, ele se dimeriza e se liga a regiões do DNA conhecidas como CRE, elementos responsivos a AMPc. Essas regiões se encontram nas zonas promotoras dos genes, assim genes que possuem essa sequência estão sujeitos à regulação pelo CREB (CARLEZON; DUMAN; NESTLER, 2005).



**Figura 2 – Alguns eventos celulares envolvidos na regulação do CREB.**

Neurotransmissores e neurotrofinas agem em receptores de membrana ( ex.: TrkB, receptores AMPA, receptores NMDA e receptores acoplados a proteína G) para desencadear cascatas de sinalização intracelular que levam à fosforilação do CREB. A fosforilação da serina 133 do CREB ativa a transcrição de genes mediada pelo CREB. As vias representadas na figura simplificam grosseiramente os muitos tipos de interação que existem entre as diferentes vias sinalizadoras. As proteínas produtos dos numerosos genes alvos do CREB são mostradas em verde. A expressão dessas proteínas pode ser específica para determinadas regiões cerebrais; cada proteína não é expressa necessariamente em todas as áreas do cérebro. Abreviaturas: CaM: calmodulina; GluR1Rs: subunidade GluR1 do receptor AMPA; PDE: fosfodiesterase; PLC: fosfolipase C; TrkB: receptor tirosina quinase de neurotrofinas tipo 2; FONTE: CARLEZON; DUMAN; NESTLER, 2005.

O uso crônico de cocaína, anfetaminas ou opióides induzem à atividade do CREB, enquanto álcool e nicotina diminuem sua atividade no NAcc, apesar de aumentá-la em outras regiões. O aumento de atividade do CREB no NAcc diminui as respostas comportamentais à cocaína, opióides e álcool, enquanto a diminuição da atividade de CREB aumenta essas respostas. O CREB também é induzido por reforços naturais como água com sacarose. Aparentemente essa regulação do CREB envolve o aumento de AMPc, que é observada no

NAcc após exposição repetida a várias drogas. (CARLEZON; DUMAN; NESTLER, 2005)

Outro fator de transcrição que é afetado pelo uso crônico de drogas é o  $\Delta$ FosB. Este é um fator de transcrição que tem um papel essencial em mudanças adaptativas de longa duração no cérebro, associadas a diversas condições como adição, doença de Parkinson, depressão e tratamento antidepressivo. É um membro da família Fos dos fatores de transcrição, que também inclui c-Fos, FosB, Fra1 e Fra2. Essas proteínas da família Fos formam heterodímeros com proteínas da família Jun (c-Jun, JunB, ou JunD) para formar fatores de transcrição ativos que então, se ligam a regiões promotoras dos genes que possuem a sequência AP-1 (TGAC/GTCA). As proteínas da família Fos são induzidas rapidamente em regiões específicas após a administração de várias drogas de abuso, mas retornam a níveis basais dentro de algumas horas. Com a administração crônica dessas drogas isoformas de  $\Delta$ FosB (35-37 kDa) se acumulam nessas mesmas regiões cerebrais, enquanto que as outras proteínas dessa família apresentam tolerância.  $\Delta$ FosB é gerado por *splicing* alternativo do gene fosB e não tem a porção c-terminal do domínio de transativação presente na FosB (McCLUNG et al, 2004; NESTLER; BARROT;SELF, 2001).

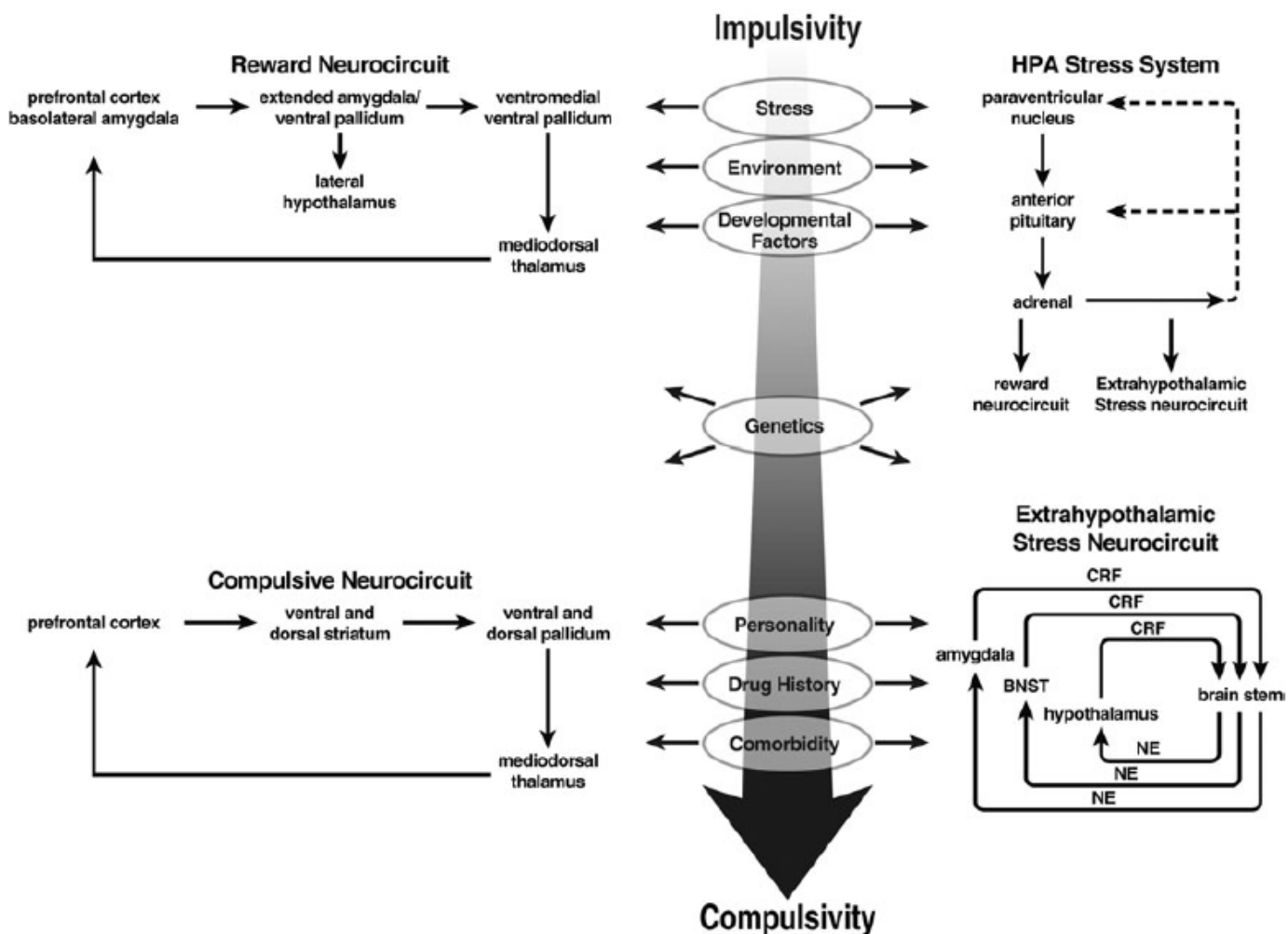
Todas as drogas de abuso, com seu uso crônico, induzem  $\Delta$ FosB, principalmente no NAcc e estriado dorsal, e em menor quantidade em várias outras regiões como córtex pré-frontal e amígdala. Camundongos *knock-out* para FosB mostraram uma sensibilidade aumentada para os efeitos locomotores e reforçadores iniciais da cocaína, mas não desenvolveram sensibilização comportamental. Existem evidências que mostram que a indução de  $\Delta$ FosB é necessária para produzir sensibilidade aumentada aos efeitos reforçadores das drogas de abuso (McCLUNG et al, 2004; NESTLER; BARROT;SELF, 2001).

Vários genes alvos para o  $\Delta$ FosB foram identificados. Sendo os que tem aumento na sua expressão o GluR2, subunidade do receptor AMPA do glutamato, o NMDAR1, subunidade do receptor NMDA do glutamato, o Cdk5, quinase ciclina dependente 5 e o fator nuclear KappaB (NF- $\kappa$ B), e a dinorfina, que tem diminuição na sua expressão (McCLUNG et al, 2004; NESTLER;BARROT;SELF, 2001).

Além dessa via, outras regiões que interagem com ela também se mostram importantes, como: amígdala, hipocampo, hipotálamo e várias regiões do córtex. Muitas dessas regiões estão associadas aos sistemas de memória. A via mesolímbica e essas outras regiões citadas, também estão envolvidas com as “adições naturais” como compulsão por sexo e por jogo (NESTLER, 2005).

GILPIN e KOOB (2008) enfatizam a importância do reforço positivo como fator motivacional para o comportamento de consumo de álcool em seus estágios iniciais do uso e abuso. Em casos de pessoas com uma doença psiquiátrica co-existente, que usam o álcool para auto medicação, o reforço negativo pode também ser importante na fase inicial do uso. Na maioria dos casos o reforço negativo passa a ser crítico na motivação do beber durante a transição para a dependência, quando ocorrem os sintomas da abstinência e o indivíduo bebe para evitar esses sintomas.

KOOB (2003) propôs uma estrutura conceitual focada em mudanças alostáticas na função do reforço que leva ao beber excessivo. Segundo ele estudos neurofarmacológicos em modelos animais fornecem evidências de uma desregulação que ocorre em mecanismos neuroquímicos específicos em circuitos cerebrais específicos ligados ao reforço e ao estresse durante o desenvolvimento da dependência. O sistema de recompensa cerebral é composto por elementos do prosencéfalo basal conhecidos como amígdala estendida (núcleo central da amígdala, leito do núcleo da estria terminal e *shell* do núcleo accumbens). Existem vários sistemas de neurotransmissores que convergem para a amígdala estendida que se tornam desregulados durante o desenvolvimento da dependência, incluindo: GABA, peptídeos opióides, glutamato, serotonina e dopamina. Além dessas estruturas, outras envolvidas com sistemas cerebrais ativadas por estresse podem contribuir significativamente para esse estado alostático. Durante o desenvolvimento da dependência o fator de liberação de corticotropina pode ser recrutado, e o sistema anti estresse do neuropeptídeo Y pode ser comprometido. Essas mudanças nos sistemas de reforço e estresse, hipoteticamente, mantêm a estabilidade hedônica em um estado alostático, oposto a um estado homeostático e disso surgiria a vulnerabilidade às recaídas nos alcoolistas em tratamento. (Figura 3)



**Figura 3 – Circuitos cerebrais recrutados em diferentes estágios do ciclo da adição enquanto a adição vai do reforço positivo para o reforço negativo.** O diagrama no canto superior esquerdo ilustra um aumento na inatividade do sistema cerebral de recompensa com um foco sobre a amígdala estendida e um aumento no circuito do restabelecimento iniciado por pistas ou pela droga com um foco no córtex prefrontal e amígdala basolateral onde ambos regem o reforço positivo e a impulsividade. O diagrama inferior esquerdo ilustra uma diminuição no sistema cerebral de recompensa e um aumento no circuito da compulsividade, ambos envolvidos com o reforço negativo e com a compulsividade. O diagrama superior direito se refere ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) o qual (a) se auto regula por retroalimentação (b) ativa o circuito cerebral de recompensa (c) facilita o circuito de estresse extra-hipotalâmico. O diagrama inferior direito se refere aos circuitos de estresse cerebral. Sobreposto na transição da impulsividade para a compulsividade estão fontes de vulnerabilidade. Estresse, desenvolvimento e ambiente teoricamente tem um influencia precoce sobre o processo. Comorbidades, personalidade e histórico de uso de drogas teoricamente tem uma participação mais tardia. A genética interfere em todos os níveis com esses fatores tanto diretamente como por fatores epigenéticos. BNST, leito do núcleo da estria terminal; CRF, fator de liberação de corticotropina; HPA, eixo hipotálamo-pituitária-adrenal; NE, noradrenalina. Fonte: KOOB e LE MOAL, 2008.

### 1.3 MECANISMO DE AÇÃO DO ETANOL

O consumo agudo e crônico de etanol interfere diferentemente com os processos de transmissão no sistema nervoso central, afetando muitos, se não todos, os sistemas de neurotransmissão conhecidos (NEVO; HAMON, 1995)

O ácido gama-aminobutírico (GABA) medeia a maioria das sinapses inibitórias rápidas via ativação dos receptores GABAA. Esses receptores são permeáveis a ânions, principalmente o cloreto, são formados por diversas combinações de subunidades e possuem vários sítios para modulação alostérica. O mais conhecido sítio alostérico é o sítio de ligação dos benzodiazepínicos, porém outras drogas como os anestésicos gerais, neuroesteroides e o etanol também modulam a atividade do receptor alostericamente. A transmissão gabaérgica é um alvo para os efeitos agudos e crônicos do etanol. Agudamente o álcool produz aumento da atividade dos receptores GABAA, esse aumento varia de acordo com a combinação de subunidades que constituem o receptor. Agudamente, o álcool também aumenta a liberação de GABA em muitas sinapses. A potencialização da transmissão gabaérgica parece contribuir para vários dos aspectos da intoxicação aguda por etanol, incluindo incoordenação motora, efeitos ansiolíticos e sedação. O sistema gabaérgico tem também modificações decorrentes da exposição crônica ao etanol. Algumas dessas adaptações parecem ocorrer no sentido de diminuir aquela potencialização do sistema observada na exposição aguda ao etanol. A mudança crônica mais bem caracterizada é a alteração nas subunidades que compõem o receptor GABAA. Ocorre também aumento ou diminuição da quantidade de GABA liberado dependendo da região cerebral. O efeito predominante dessas adaptações à presença crônica do etanol é fazer o encéfalo se tornar hiperexcitável na ausência do etanol, o que pode levar a ansiedade elevada e até mesmo convulsões durante a abstinência. Por isso benzodiazepínicos podem ser usados durante a abstinência do etanol (LOVINGER, 2008)

O glutamato medeia a maioria das sinapses excitatórias rápidas via ativação dos receptores AMPA, kainato e NMDA. Esses receptores são permeáveis a cátions, principalmente sódio e cálcio. O etanol agudamente inibe a transmissão sináptica glutamatérgica, principalmente a mediada por receptores NMDA. Essa inibição do NMDA provavelmente contribui para os

efeitos deletérios do etanol sobre a memória, que é dependente da atividade desses receptores. A exposição crônica ao etanol aumenta o número e a atividade do receptor NMDA, o que também contribui para o estado de hiperexcitabilidade durante a abstinência, assim como para o dano neural causado pelo etanol (excitotoxicidade). (LOVINGER, 2008)

A adenosina é um nucleosídeo purínico produzido durante o metabolismo dos ácidos nucleicos. Tem sua ação pelos receptores A1 (ligado a Gi/o) e A2a (ligado a Gs/olf). Agudamente o etanol aumenta a transmissão adenosinérgica em cultivos de células de origem neuronal. Esse efeito parece ser pela inibição do transportador que normalmente produz uma rápida retirada da adenosina da fenda sináptica para o interior da célula. A exposição crônica ao etanol causa um *downregulation* compensatório dos receptores A2a e diminui a sinalização via adenilato ciclase desses receptores. (LOVINGER, 2008)

A serotonina é uma monoamina originada em pequenos grupamentos de neurônios localizados na base do encéfalo (núcleos da rafe). Tem sua ação através de 15 tipos de receptores, a maioria deles acoplados a proteína G (5-HT-1,2,4,5,6,7 e seus subtipos) e um receptor ionotrópico (5-HT3, canal de sódio). Agudamente, o etanol tem efeitos mistos sobre a transmissão serotoninérgica. É observada uma maior demora para que ocorra a recaptação da serotonina da fenda sináptica, e a potencialização da função do receptor 5-HT3. Cronicamente, o etanol interage de várias formas com esse sistema o que pode alterar a ansiedade e o estado afetivo. (LOVINGER, 2008)

O etanol tem ainda ação sobre outros sistemas como o opioideérgico, o endocanabinoide (aumento de araquinodoil etanolamina e 2-araquinodoil etanolamina; *downregulation* de receptores CB1). O etanol agudamente diminui a sinalização mediada pelo BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) e cronicamente leva ao aumento de BDNF em várias regiões cerebrais. A exposição aguda e crônica ao etanol podem ainda aumentar os níveis de cortisol, progesterona e alopregnenolona e interfere também com a dopamina, como já explicado anteriormente. (LOVINGER, 2008)



#### **1.4 MODELOS ANIMAIS EM PSICOFARMACOLOGIA (ALMEIDA, 2006)**

Uma limitação dos modelos animais em psicofarmacologia é a característica subjetiva dos transtornos mentais, uma vez que os modelos animais se fundamentam na observação do comportamento do animal. Embora essa limitação seja intransponível, os resultados experimentais com os modelos têm contribuído de forma significativa para o desenvolvimento das neurociências.

Uma possível análise do comportamento animal é a etológica. Ela aborda os complexos padrões comportamentais específicos da espécie, particularmente em relação às situações de sobrevivência. Esses comportamentos (função motora, sexual, cuidado com os mais jovens, comportamento social, interação com predadores, etc.) são resultados de processos filogenéticos e ontogenéticos, sendo expressos no ambiente natural. Portanto, não haveria necessidade de condicionamento ou a indução de comportamentos artificiais (como pressionar uma barra). Na interpretação de resultados experimentais e na sua extrapolação para a clínica deve-se considerar que não existem modelos animais ideais para os transtornos mentais. Mais ainda, não existem modelos “puros”, ou seja, o comportamento exibido por um animal, embora possa ter uma motivação principal, é sempre contaminado por outros fatores. Por exemplo, o comportamento dos animais em vários modelos animais de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado, sofre influência da atividade locomotora. Sendo assim, a melhor estratégia para prever um possível efeito farmacológico em humanos é a utilização de pelo menos dois modelos que procurem avaliar um mesmo aspecto do comportamento, associados a modelos que avaliem possíveis variáveis intervenientes.

A validade, em suas diversas formas, é o critério que mais tem sido estudado nos modelos animais. A validade preditiva consiste na capacidade do teste em prever algum aspecto clínico de interesse do pesquisador, isto é, partindo-se de dados obtidos no modelo, deve-se ser capaz de prever resultados (eventos) clínicos. A abordagem da validade preditiva mais utilizada

é a capacidade do modelo em detectar drogas potencialmente úteis na clínica (também chamado de isomorfismo farmacológico).

A validade de construção avalia as similaridades entre os processos subjacentes ao comportamento exibido no modelo e os processos do transtorno psicopatológico que se pretende avaliar. Deste modo, haveria necessidade da existência de teorias para explicar os processos fisiopatológicos envolvidos no transtorno mental considerado e no modelo.

A validade de conteúdo relaciona-se com a precisão com que o modelo avalia o que se pretende medir. Embora seja considerada uma das mais importantes propriedades de um modelo, é dificilmente avaliada, principalmente porque os diagnósticos clínicos são constantemente mudados e aperfeiçoados.

A validade etiológica está intimamente relacionada com a validade de construção e ocorre quando o modelo animal e o quadro clínico possuem a mesma etiologia. Entretanto, a etiologia dos quadros psiquiátricos é raramente conhecida, e é exatamente um dos objetivos dos modelos animais: auxiliar no estudo da etiologia e da fisiopatologia dos transtornos mentais.

A validade convergente ou discriminante descreve o grau de correlação entre modelos que avaliam o mesmo quadro clínico ou sintoma (convergente) ou quadros clínicos e sintomas distintos (discriminante). Por exemplo, observamos uma validade discriminante boa quando um modelo de depressão apresenta uma baixa correlação com um modelo de esquizofrenia.

Por último, a validade de face refere-se às similaridades entre os comportamentos observados no modelo e os sintomas específicos dos quadros clínicos. É de difícil interpretação, uma vez que as similaridades entre comportamentos e reações fisiológicas interespecies não implicam necessariamente a mesma fisiopatologia, construindo geralmente similaridades superficiais.

### **1.5 Modelos Animais de Dependência/ Adição**

Nos modelos animais para drogas de abuso, dois objetivos principais são almejados. O primeiro deles visa estudar as conseqüências do uso crônico das drogas, incluindo o desenvolvimento de tolerância/sensibilização e a dependência física/síndrome de abstinência. Nesses modelos, a droga é

administrada pelo pesquisador de maneira forçada através da dieta, de intubação gástrica, por injeção ou até mesmo por inalação. O segundo objetivo visa estudar no animal o comportamento de procura à droga. Os modelos de comportamento de procura à droga tentam demonstrar as propriedades reforçadoras das drogas, as quais se acreditam desempenhem um papel central no desenvolvimento da dependência (SPANAGEL, 2000; MEISCH, 2001).

Os modelos animais desenvolvidos até o momento para estudar dependência de drogas podem ser classificados em três grupos: modelos que estudam as propriedades reforçadoras positivas, modelos que estudam as propriedades reforçadoras negativas e modelos que tentam mimetizar aspectos diferentes da adição, como o uso compulsivo (*craving*), a recaída e a perda do controle sobre o uso. (SHIPPENBERG; KOOB, 2002; SPANAGEL, 2000).

#### *1.5.1. Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Positivas*

As drogas de abuso funcionam como estímulos reforçadores positivos, sendo essa sua propriedade a base conceitual para a auto-administração das drogas. Duas abordagens para o estudo da auto-administração das drogas são empregadas: a preferência oral e o comportamento operante. Na primeira abordagem, os animais têm, em suas gaiolas-casas, livre acesso à droga e escolhem livremente entre água e uma ou várias soluções contendo diferentes concentrações da droga. Normalmente, os animais devem escolher entre duas garrafas, uma contendo a droga, que pode ser adoçada ou não, e a outra contendo uma solução sem a droga. A proporção de droga ingerida em relação ao consumo total de líquidos é usada para caracterizar a preferência pela droga (CUNNINGHAM et al., 2000). Esse modelo de preferência é mais utilizado para o estudo do álcool, inclusive tem sido usado como base para seleção genética entre animais que preferem (P - *preferring*, sP – *Sardinian preferring*) e os que não preferem álcool (NP – *non-preferring*, sNP – *Sardinian non-preferring*) (LI, 2000). Existem também estudos usando cocaína (JENTSCH, 1998). A limitação desse tipo de modelo é que não se pode dizer que o fato do animal preferir a droga signifique que ele esteja dependente. Apenas é possível interpretar que o animal procura a droga quer seja por suas

propriedades reforçadoras positivas, quer pelas negativas (por exemplo, esses animais selecionados geneticamente como P, são animais mais ansiosos e apresentam menores níveis de serotonina no SNC) (US DEPARTMENT, 2000).

Na abordagem que utiliza o condicionamento operante (auto-administração operante), a preferência entre água e droga também pode ser medida após treinar os animais para obter água ou droga pressionando uma de duas alavancas (uma para cada líquido) existentes na gaiola ou aprender a percorrer um túnel para obter a droga. A droga pode ser obtida por via oral, por intubação gástrica, por injeção intravenosa ou por injeção intracraniana, dependendo das características da droga e do esquema de condicionamento operante. Por exemplo, o álcool não pode ser administrado por via endovenosa ou intracraniana por ser difícil o controle seguro da sua dose. A quantidade da droga que o animal consome está relacionada à quantidade de trabalho que ele realiza. Esses estudos permitem avaliar não somente a preferência pela droga, mas também a motivação do animal para trabalhar para obter a droga em diferentes condições e demonstram claramente as propriedades reforçadoras positivas das drogas (KOOB, 2000). Outra abordagem é a auto estimulação intracranial. Nesse procedimento ratos que tiveram eletrodos implantados em determinadas regiões cerebrais, relacionadas com a mediação dos efeitos reforçadores do etanol, podem se auto administrar choques nessas regiões via condicionamento operante padrão. (GILPIN; KOOB, 2008)

Outro modelo usado para estudar as propriedades reforçadoras positivas das drogas envolve o aprendizado de tarefa de preferência condicionada de lugar. Esse modelo é um procedimento de condicionamento clássico no qual a administração de uma droga por injeção é pareada com um ambiente determinado e a administração de placebo é pareada com um ambiente distinto. Após vários pareamentos, expõem-se os animais, sem ter recebido injeção, à mesma tarefa permitindo seu livre acesso aos ambientes e medindo o tempo gasto em cada ambiente e em cada acesso. Quando o animal escolhe passar a maior parte do tempo no ambiente pareado com a droga interpreta-se como uma medida direta do efeito reforçador positivo da droga. Drogas com propriedades aversivas apresentarão efeito contrário, ou seja, os animais permanecerão menos tempo no ambiente pareado com a droga. Drogas que produzem preferência condicionada para ambientes associados à droga são

aquelas que funcionam como reforçadores positivos em outros paradigmas (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

### *1.5.2 Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Negativas*

Os efeitos reforçadores negativos do etanol podem ser estudados usando os modelos descritos anteriormente, com a diferença que o animal é testado durante a abstinência forçada do etanol (GILPIN; KOOB, 2008).

Vários modelos animais têm abordado esse fenômeno, seja induzindo uma dependência física através da administração forçada da droga (inalação em uma câmara, infusão intragástrica, dieta líquida balanceada contendo a droga como única fonte de líquido e alimento), ou da ingestão voluntária por condicionamento operante ou não. Quando o animal desenvolve a dependência física e então, apresenta a síndrome de abstinência na retirada da droga, observa-se que o consumo na reapresentação da droga pelos animais dependentes é maior do que pelos não-dependentes, mesmo quando os sintomas da abstinência são brandos. As respostas dos animais ao longo de sessões de abstinência tornam-se mais estáveis, sugerindo que eles aprendem a responder de uma forma controlada para minimizar e evitar os sintomas da abstinência (US DEPARTMENT, 2000).

Também se pode avaliar as propriedades reforçadoras negativas das drogas em modelos de aversão condicionada de lugar. Neste modelo parecia-se um ambiente determinado com a manifestação da síndrome de abstinência e um outro ambiente com a ausência da síndrome. Este modelo tem sido descrito na literatura para o estudo das propriedades reforçadoras dos opiáceos (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

Modelos que consideram os efeitos discriminantes das drogas também têm sido usados para estudar as propriedades reforçadoras negativas. Animais dependentes de diazepam, opiáceo ou álcool foram treinados a discriminar entre salina e pentilenotetrazol, uma droga ansiogênica. Durante a fase de abstinência daquelas drogas para as quais estavam dependentes, os animais escolhiam as pistas do pentilenotetrazol, sugerindo a presença do componente de ansiedade na abstinência. (BRANDT; FRANCE, 1998; EMMETT-OGLESBY et al., 1990)

Modelos para avaliar ansiedade em animais, como o labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, enterrar objetos, interação social, entre outros, também são empregados para avaliar as propriedades reforçadoras negativas de algumas drogas que causam efeito ansiolítico, como o etanol e o diazepam. Desta forma, pode-se estudar o efeito ansiolítico manifestado após a administração aguda ou crônica destas drogas, além da sua presença na síndrome de abstinência. (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000).

### *1.5.3. Modelos de Adição: Procura à Droga, Uso Compulsivo e Recaída*

Durante os últimos 20 anos, foram desenvolvidos novos modelos animais propostos para estudar o *craving* (desejo persistente pelo álcool), a recaída e a perda de controle, que são componentes humanos subjetivos da dependência (HEYMAN, 2000; PHILLIPS, 2002; SHIPPENBERG; KOOB, 2002; SPANAGEL, 2003).

Modelos de consumo aumentado da droga após exposição prolongada têm permitido estudar a transição entre uso moderado e controlado para uso excessivo e descontrolado. Esses modelos têm sido descritos para cocaína, opiáceos e álcool. Nestes modelos, várias abordagens experimentais têm sido empregadas: auto-administração intravenosa, intracraniana e oral, auto-administração operante ou por livre escolha, ou até administrar previamente de maneira forçada para induzir síndrome de abstinência e então reapresentar a droga para sua auto-administração (AHMED; KOOB, 1998; AHMED; KOOB, 1999; AHMED; WALKER; KOOB, 2000; ROBERTS et al., 2000).

O modelo de condicionamento operante, já descrito, é utilizado nessa abordagem para avaliar o comportamento de procura pela droga, analisando-se a motivação do animal para obter a droga (CUNNIGHAM et al., 2000; TABAKOFF; HOFFMAN, 2000; PANILILIO; GOLDBERG 2007). Primeiramente, os animais são treinados para realizar uma determinada tarefa (normalmente pressionar uma alavanca) para receber a droga. Então, ajusta-se o número de vezes que o animal precisa pressionar a alavanca para receber uma quantidade de droga (taxa de reforço variável) e assim é possível estudar a disposição dos animais em “trabalhar” para conseguir a droga. Depois que os

animais aprendem a executar a tarefa, a droga é retirada e os animais, normalmente, param de pressionar a alavanca. Na etapa seguinte, apresentam-se diferentes estímulos aos animais para avaliar se algum deles faz com que o animal recupere seu comportamento de procura pela droga (pressionar a alavanca). O estresse, injeções com pequenas quantidades da droga (*priming*) e estímulos condicionados pareados previamente com a administração da droga são capazes de gerar a reinstalação do comportamento de procura. É conhecido que em modelos de condicionamento clássico os estímulos ambientais repetidamente pareados com reforçadores primários podem adquirir propriedades de incentivo (MCFARLAND; ETTEMBERG, 1997; SEE et al., 1999; WEISS et al., 2000). Tem sido postulado que esses efeitos reforçadores condicionados contribuiriam para o *craving* pela droga e para a recaída da dependência. Estudos em humanos também têm demonstrado que a apresentação de estímulos previamente associados à droga promove aumento na probabilidade de recaída e também de relatos de *craving* e de motivação para obter a droga demonstrando a analogia desses modelos com o que se observa em humanos (CHILDRRESS et al., 1988; O'BRIEN et al., 1992).

Esse tipo de modelo foi inicialmente desenvolvido para auto-administração intravenosa de estimulantes e opióides (AHMED; KOOB, 1998; AHMED; KOOB, 1999; AHMED; WALKER; KOOB, 2000; ALTSHULER; PHILLIPS; FEINHANDLER, 1980) e, mais recentemente foi aplicado para a auto-administração oral de álcool (COLOMBO, 1997; COPER; ROMMELSPACHER; WOLFFGRAMM, 1990; CRABBE; WAHLSTEN; DUDEK, 1999). Esses modelos têm sido empregados para estudar possíveis medicamentos *anti-craving* e anti-recaída. No entanto, não se pode afirmar que os animais submetidos a esses modelos estejam verdadeiramente dependentes ou adictos, uma vez que a resposta que eles exibem para consumir álcool ou outras drogas não é controlada por comportamentos naturais do seu repertório (SPANAGEL, 2000).

No modelo de auto-administração por livre-escolha, os animais podem escolher entre água e soluções da droga em diferentes concentrações em suas gaiolas-casas. Após um período prolongado de livre acesso à droga segue uma fase de privação (abstinência) na qual os animais permanecem abstinentes por

alguns dias ou até semanas. Em seguida, todas as soluções contendo droga são então novamente oferecidas. Este procedimento é repetido várias vezes num período normalmente de um ano. A reapresentação das soluções da droga leva a um aumento temporário no seu consumo e na preferência que é chamado de efeito da privação da droga. Nessa fase os animais consomem maiores quantidades das soluções da droga da mais alta concentração, ocorre ainda uma alteração no ciclo diário normal dos animais, que passam a ingerir a droga durante a fase clara do dia, na qual os animais costumam permanecer mais inativos (SPANAGEL; HÖLTER, 2000; SPANAGEL, 2000).

Também naqueles modelos nos quais os animais precisam executar uma tarefa para receber a droga como recompensa, demonstra-se que o consumo e a preferência pela droga aumentam após uma fase de privação. Os efeitos experimentados durante a fase de privação da droga representam uma situação de aumento da motivação para trabalhar para obtê-la, o que é compatível com a definição de *craving*. (SPANAGEL, 2000)

Por último um modelo proposto por WOLFFGRAMM e HEYNE (1995) e WOLFFGRAMM e colaboradores (2000) utiliza ratos expostos a um paradigma de auto-administração oral por livre escolha. Os animais têm livre acesso à água e a diferentes soluções de etanol com concentrações de 5, 10 e 20 % em suas gaiolas-casas individuais. Esta múltipla escolha é necessária, pois cada rato tende a preferir certa concentração e assim, oferecer uma escolha binária entre água e uma única concentração de álcool, poderia levar a resultados enganadores. Inicialmente, o comportamento de ingestão de álcool é exploratório e durante esse período, denominado fase de aquisição, observam-se dias de alto consumo intercalados com dias de quase abstinência. Nessa fase, os ratos experimentam os efeitos psicotrópicos do álcool e ajustam seu comportamento de ingestão.

Na seqüência, cada rato desenvolve seu padrão individual de consumo que permanece estável durante vários meses. Esta fase é chamada de fase de consumo constante. Após seis meses de acesso contínuo ao álcool, os ratos gradualmente modificam seu padrão sendo que alguns apresentam aumento do consumo nos meses subseqüentes (fase de aumento da demanda). Os animais, então, são submetidos a um longo período de abstinência de nove meses. Após esse período, eles novamente têm acesso às soluções de álcool.



Alguns ratos exibem alto consumo e preferência pelo álcool nesse período de reapresentação (WOLFFGRAMM, 1990).

Além disso, o comportamento aditivo, definido por uma perda de controle sobre a ingestão de álcool, pode ser testado através da continuação do consumo de álcool quando da adulteração do sabor com quinino que produz um sabor amargo aversivo. Esta adulteração das soluções de álcool reduz substancialmente o consumo nos animais não-adictos, enquanto que, animais adictos reduzem pouco a ingestão de álcool, de modo que seu consumo e preferência pelo etanol continuam significativamente maiores do que os dos animais controles (WOLFFGRAMM, 1990).

Esse modelo utilizado por WOLFFGRAMM (1990) foi validado para camundongos em nosso laboratório (FACHIN-SCHEIT et al., 2006), com a droga naltrexona, antagonista opióide considerada como anti-*craving* em alcoolistas humanos. Os resultados obtidos com a naltrexona mostraram diminuição do consumo de etanol nos camundongos com padrão de consumo pesado e leve, considerados como não adictos no modelo, enquanto que os camundongos adictos continuaram com seu padrão de consumo. Estes dados foram interpretados como a naltrexona sendo antagonista das propriedades reforçadoras positivas do álcool, porém sem efeito anti-*craving* (FACHIN-SCHEIT et al., 2006).

## **1.6 ANSIEDADE**

### ***1.6.1 Ansiedade: Definição e caracterização***

Ansiedade pode ser definida como um estado emocional desagradável no qual existem sentimentos de perigo iminente, caracterizado por inquietação, tensão ou apreensão (KAPLAN; SADOCK, 1984). Traduz-se, frequentemente, por reações físicas, tais como: aumento da frequência respiratória, do pulso, da pressão arterial, transpiração excessiva, tensão da musculatura esquelética, alterações gastrointestinais (dor, náuseas, vômito), disfunção genito-urinária (polaciúria, disúria, impotência) (EISENDRATH; BROPHY, 1995). A diferenciação entre medo e ansiedade tem um valor relativo e limitado. Praticamente, entende-se por medo, a resposta a um perigo real, e por

ansiedade, ao resultado de causas obscuras, irracionais ou indefinidas (SOLOMON; PATCH, 1975).

Qualquer indivíduo pode apresentar ansiedade em uma ou outra ocasião. A ansiedade é uma resposta normal às ameaças dirigidas ao nosso corpo, propriedades, modo de vida, entes queridos ou valores estimados. É normal durante tensões extremas ou em situações da vida que rapidamente se modificam e exigem contínua adaptação. A ansiedade "normal" estimula o indivíduo para uma ação útil e desempenha um papel importante quanto às modificações benéficas e desenvolvimento da personalidade. Em contraste, a ansiedade excessiva não somente torna o indivíduo infeliz, como atua de modo deletério sobre seu desempenho (SOLOMON; PATCH, 1975).

Existem diferenças constitucionais quanto à tendência em se tornar ansioso; as amplas diferenças na observação da reatividade neurovegetativa e outras medidas de temperamento entre recém nascidos, sugerem uma base genética. Além disso, cada indivíduo adulto tem sua própria história de diferentes experiências que poderia levar a diferentes manifestações emocionais. Os fatores culturais são importantes no estabelecimento da ansiedade. Valores recebidos por instituições educativas e religiosas, a estrutura legal e o próprio nível individual de integração sócio cultural, todos contribuem para a determinação da incidência de culpa e de conduta que visam objetivos mutuamente exclusivos (conflito) e que causam a ansiedade (SOLOMON; PATCH, 1975).

O julgamento da ansiedade como algo normal ou anormal dependerá de sua intensidade e duração, e das circunstâncias que a provocaram. A ansiedade é considerada como patológica quando parece ser desencadeada por alguma razão mínima, ou ocorre sem causa conhecida ou, quando é inusitadamente grave e persistente. A cronicidade da ansiedade é uma evidência de que não está mais atuando como um sinal de perigo, mas que se tornou ela mesma uma ameaça (EISENDRATH; BROPHY, 1995).

### *1.6.2 Classificação dos Transtornos de Ansiedade*

Os transtornos de ansiedade estão entre os mais comuns de todas as condições psiquiátricas. Além disso, a ansiedade é um sintoma importante em

quase todas as doenças psiquiátricas. Vários estudos apontam para 5 a 15 % da população apresentarem ansiedade clinicamente significativa pelo menos uma vez na vida (EISENDRATH; BROPHY, 1995).

Sempre foi uma preocupação dos psiquiatras estabelecerem critérios para o diagnóstico diferencial das diferentes manifestações da ansiedade, e isto pode ser notado desde a identificação original da síndrome de ansiedade proposta por HECKER (1893) e FREUD (1894).

Em 1980, a Associação Americana de Psiquiatria introduziu no DSM-III (*Diagnostic Statistic Manual-3rd edition*, uma revisão de outros manuais já publicados anteriormente) alterações que permitiram pela primeira vez diagnosticar transtornos de ansiedade, usando critérios operacionais e estabelecer claras distinções entre os diferentes diagnósticos. Em seguida, a revisão e a atualização desta publicação (APA, 1987 e APA, 1994), introduziram pequenas alterações, objetivando um aprimoramento dos critérios para o diagnóstico dos diferentes transtornos de ansiedade: Transtorno de Ansiedade Generalizada, Agorafobia sem História de Transtorno de Pânico, Fobia Específica, Fobia Social, Transtorno de Pânico com ou sem Agorafobia, Transtornos Obsessivos Compulsivos, Transtorno de Estresse Pós-traumático, Transtorno de Ansiedade Decorrente de Condição Médica, Transtorno de Ansiedade Induzida por Droga e Transtorno de Ansiedade Ainda Não Especificada.

O Transtorno de Ansiedade Generalizada é uma síndrome caracterizada por ansiedade excessiva ou sem fundamento real, e uma preocupação exagerada com circunstâncias da vida, presente durante pelo menos 6 meses. Pelo menos três dos seguintes sinais e sintomas específicos são identificáveis neste transtorno: tensão motora, hiperatividade autonômica, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, alteração do sono e vigilância excessiva.

O Transtorno de Pânico sem Agorafobia é uma síndrome cuja característica essencial é a ocorrência de ataque abrupto de pânico espontâneo atingindo um pico após 10 minutos, em ocasiões inesperadas, manifestada por um período de medo intenso ou desconforto, não associado à situações específicas provocadoras de ansiedade. Os ataques de pânico manifestam-se pelo aparecimento súbito de uma apreensão intensa, medo ou terror, associados frequentemente com sentimentos de catástrofe iminente

apresentando pelo menos quatro dos seguintes sinais e sintomas: dispnéia, palpitações, mal-estar ou dores torácicas, sensações de sufocação ou estrangulamento, tonturas, vertigens ou sensações de instabilidade, sentimento de irrealidade, sudorese, parestesias, ondas de calor ou de frio, desmaios, tremores ou contrações musculares e também medo de morrer, enlouquecer ou de cometer um ato descontrolado durante o ataque. Os ataques duram, geralmente, minutos. Os ataques são seguidos por uma ou mais das seguintes manifestações: preocupação persistente em apresentar outros ataques, medo das implicações dos ataques ou de suas consequências e mudanças significativas do comportamento relacionado ao ataque.

O Transtorno de Pânico com Agorafobia caracteriza-se por uma complicação do distúrbio anterior apresentando o desenvolvimento de um medo antecipatório de não poder fazer nada para evitar o ataque ou de perder o controle durante a sua manifestação, desencadeando, no indivíduo, um medo de ficar sozinho em lugares públicos, longe de casa, em situações cujo escape possa ser difícil ou embaraçoso.

No Transtorno Obsessivo-Compulsivo, as características essenciais consistem em obsessões ou compulsões recorrentes. Obsessões são idéias, pensamentos, imagens ou impulsos persistentes e recorrentes, estranhos à vontade do indivíduo, que lhe invadem a consciência e lhe parecem absurdos ou repugnantes. Compulsões são comportamentos repetitivos e sem objetivo aparente, executados segundo certas regras ou estereotipadamente. As obsessões mais comuns são pensamentos repetitivos de violência, contaminação e dúvida. As compulsões mais comuns implicam lavagem das mãos, contagens, verificações e tocar desnecessariamente em pessoas ou objetos. Quando o indivíduo tenta resistir a uma compulsão, sente uma tensão constante (ansiedade), que pode ser imediatamente aliviada cedendo à compulsão.

No Transtorno de Estresse Pós-traumático, a característica essencial consiste no desenvolvimento de respostas de intenso medo, desamparo ou terror em consequência de um acontecimento psicologicamente traumático, geralmente fora do comum (catástrofes, acidentes, guerras). Os sintomas característicos desta síndrome implicam a revivência do acontecimento traumático através de imagens, pensamentos ou sonhos, uma redução da

resposta ao mundo exterior e no contato com ele, e diversos sintomas neurovegetativos, disfóricos ou cognitivos.

Na Fobia Específica, a característica essencial consiste no medo persistente e irracional de um objeto, atividade ou situação específica, que provoca um desejo compulsivo de evitá-los. O indivíduo reage com ansiedade à presença ou à antecipação da situação fóbica, apresentando alteração da sua rotina normal de trabalho, estudo ou recreação. O indivíduo tem consciência que o medo é excessivo ou irracional, mas não consegue evitá-lo. As situações mais comuns são as que envolvem animais como objetos (cães, cobras, aranhas), ou as situações de medo de altura (acrofobia) ou medo de espaços fechados (claustrofobia). A Fobia Social consiste num medo persistente e irracional e no desejo compulsivo de evitar situações nas quais o indivíduo seja exposto a pessoas não familiares ou possa ser atentamente observado por outros. A manifestação desta desordem é muito semelhante ao quadro de Fobia Específica.

A Agorafobia sem História de Ataque de Pânico consiste num medo acentuado de estar sozinho, ou em lugares públicos donde seja difícil ou embaraçoso sair, ou recear uma inexistência de ajuda em caso de doença súbita.

## **1.7 NEUROBIOLOGIA DA ANSIEDADE**

Não seria exagero dizer que todo o organismo está envolvido na resposta e modulação ao estresse e ao medo. Esses estados são modificados e tem impacto sobre todos os maiores sistemas: motor, sensorial, endócrino, imune, cardiovascular e neural. (MILLIAN, 2003)

### ***1.7.1 Reações de defesa*** (GRAY; MCNAUGHTON, 2000)

As raízes da ansiedade e do medo estão nas reações de defesa dos animais diante de estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem estar ou à integridade física. O perigo ou a ameaça podem estar representados, por exemplo, por predadores ou estímulos a eles associados, por estímulos ambientais (altura, iluminação), por alteração no

ambiente (tempestades, incêndios, lugares novos), por estímulos nociceptivos (choques elétricos) ou pelo ataque ou confronto com animais da mesma espécie. Ante esses estímulos, os animais procuram responder segundo quatro estratégias comportamentais básicas: fuga, imobilização, ataque defensivo e submissão.

A escolha de uma dessas estratégias é feita levando-se em conta fatores como a característica do ambiente em que o estímulo indicador de perigo é experienciado, a proximidade do estímulo, as experiências anteriores em situações semelhantes, a posição do indivíduo na hierarquia social de seu grupo e a sua familiaridade com o ambiente.

Os estudos conduzidos por Robert e Caroline Blanchard analisaram a resposta de ratos e camundongos frente a predadores, classificando o tipo de estratégia defensiva adotada de acordo com o nível de ameaça ao qual os animais são submetidos, sendo: potencial ou incerta, distal e proximal.

O nível potencial evoca comportamentos de exploração cautelosa em direção à fonte de perigo. Esses comportamentos refletem hesitação e visam a avaliação de risco, sendo caracterizada por repetidas tentativas de aproximação seguidas de esquivas ao estímulo aversivo. Essas respostas de avaliação de risco são frequentemente observadas mediante estímulos parciais associados aos predadores, como objetos impregnados com o odor do predador, ou quando da retomada da exploração de ambientes em que a presença do predador fora outrora detectada.

O nível distal induz tanto a resposta de esquiva como de imobilidade. O animal tenta preferencialmente escapar da situação de perigo, caso exista uma rota de saída no ambiente do encontro com o predador. No entanto o animal tende a ficar imóvel, no chamado “congelamento”, caso a fuga não seja viável e/ou o predador mantenha ainda certa distancia.

Ao nível proximal, quando o predador está muito próximo ou já em contato com a presa, tentativas descontroladas e não direcionadas de fuga, ou respostas de agressão defensiva podem ser os recursos defensivos mais eficazes para inibir a ação predatória. Nesta mesma situação algumas espécies podem permanecer no estado de imobilidade tônica (fingirem-se de mortos). Ao assumir esse estado os animais podem diminuir o interesse do predador, visto

que para muitas espécies apenas alvos vivos e móveis desencadeiam o ataque.

A essa análise etoexperimental Gray e McNaughton adicionaram elementos da teoria da aprendizagem ao incluírem, no primeiro nível de defesa, estímulos condicionados que sinalizam punição ou a perda de uma recompensa esperada.

As principais regiões cerebrais candidatas a serem responsáveis pela ansiedade são: substância cinzenta periaquedutal; hipotálamo; amígdala; sistema septo-hipocampal; e córtex frontal e cingulado. Cada uma dessas regiões tem um papel nos comportamentos defensivos e nos estados emocionais que acompanham esses comportamentos, assim como essas estruturas interagem entre si.

#### *1.7.2 Sistema de Aproximação Comportamental (SAC) (DEPUE; COLLINS, 1999)*

O SAC tem como função incentivar a busca da fonte de satisfação de necessidades fisiológicas, alimento, abrigo, sexo, entre outros. Segundo Depue e Collins, (1999) uma rede corticolímbica-estriatal-talâmica (1) integra o contexto da saliência do incentivo no córtex orbital medial, amígdala e hipocampo, (2) codifica a intensidade do estímulo incentivador em um circuito motivacional composto pelo NAcc, pálido ventral, e sistema de projeção dopaminérgica da área tegmental ventral e (3) cria um estado de incentivo motivacional que pode ser transmitido ao sistema motor.

#### *1.7.3 Sistema Cerebral de Defesa (SCD) (GRAY; MCNAUGHTON, 2000)*

O sistema de defesa pode ser visto de forma hierárquica, no qual o nível mais baixo, a substância cinzenta periaquedutal, coordena a fuga não direcionada; o hipotálamo medial coordena a fuga direcionada; a amígdala coordena a esquiva ativa; e o cíngulo anterior coordena esquivas ativas mais complexas.

Existe uma dissociação entre os transtornos de ansiedade que pode ser avaliado farmacologicamente e foi percebido pela primeira vez por Donald Klein testando a imipramina em pacientes. Assim pode-se dizer que existem drogas que melhoram a ansiedade antecipatória mas não os ataques de pânico. Isso significa que existem sítios diferentes para o controle dessas reações.

O sítio do pânico parece ser a matéria cinzenta periaquedutal (MCP). Essa região é responsável pelas respostas imediatas ao predador: congelamento, luta, fuga, resposta autonômica e analgesia e é ativada pela presença do predador, pela presença de um dominante da mesma espécie, pela dor e por altos níveis de monóxido de carbono. A fuga desencadeada pela estimulação dessa região não é direcionada, tanto que os animais colidem em obstáculos ao invés de desviá-los. A MCP parece ser o nível mais inferior do sistema de defesa, porém é também o centro mais especializado na geração da resposta tipo “luta-fuga”. Existem eferências ascendentes à MCP, principalmente nociceptivas, assim como eferências descendentes vindas do córtex frontal medial, córtex lateral, amígdala, núcleo do leito da estria terminal, telencéfalo basal e hipotálamo (principalmente o medial). Lesões na amígdala e hipotálamo medial não afetam as reações de defesa geradas pela MCP enquanto que a destruição da MCP bloqueia o efeito comportamental da estimulação da amígdala ou do hipotálamo medial. Assim sendo a MCP é vista como a via final “comum” da defesa afetiva.

A matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) se conecta ao hipotálamo medial (HM), onde a coordenação de mecanismos de fuga mais sofisticados parecem estar alocados. O HM parece ter funções bastante similares às da MCP, porém a resposta desencadeada pelo HM está em um nível superior de organização. Ao contrario da resposta não direcionada iniciada pela estimulação da MCP, a ativação química do HM produz uma fuga direcionada. A ativação do HM reduz a agressão defensiva em animais e a lesão do HM aumenta a agressão, o contrario do que é visto com a MCP. Isso é o que se esperaria de um sistema hierárquico. Como a MCP é ligada à resposta não direcionada, essa resposta pode levar em direção ao predador, o que levaria à necessidade de ataque. Se o HM está ligado à fuga organizada, uma tentativa de ataque ao predador atrapalharia essa resposta e teria conseqüências potencialmente desastrosas.

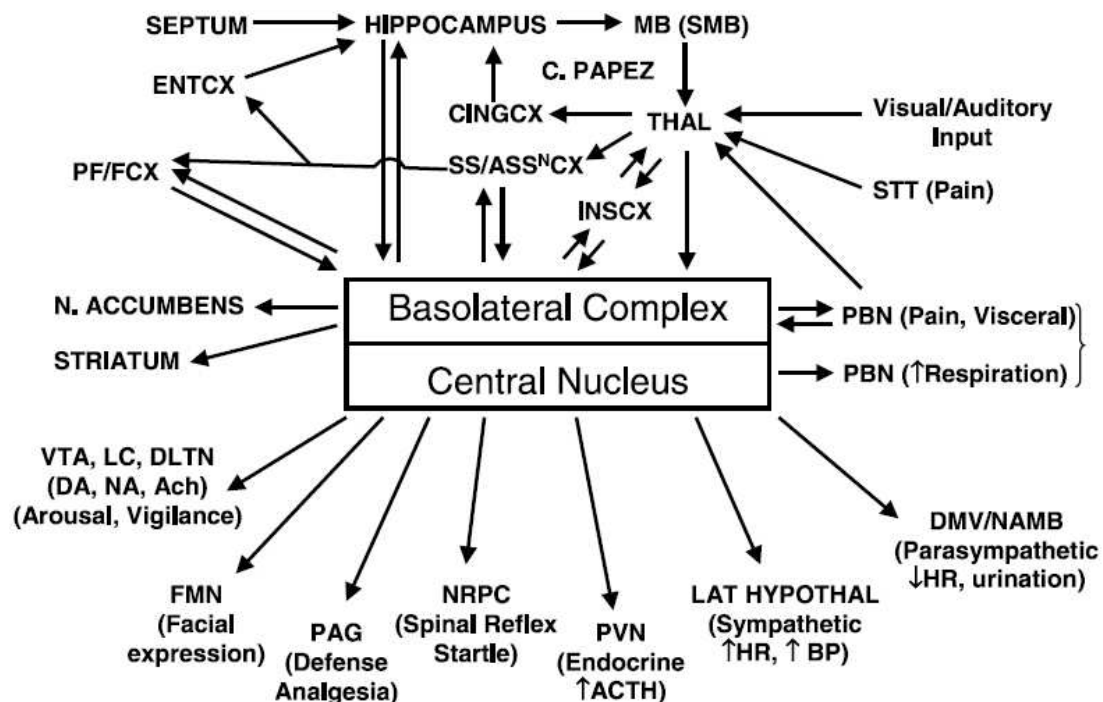


O hipotálamo (agora principalmente a região lateral) tem um papel fundamental na coordenação da resposta neuroendócrina à ansiedade. Essa resposta é feita principalmente pela ativação do eixo hipotálamo pituitária adrenal. Essa é uma importante via final comum em todas as reações de ansiedade e estresse, incluindo estresse crônico e depressão.

A amígdala tem sido considerada o centro modulador da resposta ao medo e tem um papel importante na memória e na modulação do comportamento social e emocional. As vias aferentes derivam principalmente do núcleo central e do núcleo do leito da estria terminal, enquanto que o complexo basolateral da amígdala é o principal responsável pelo recebimento e filtração dos sinais sensoriais vindos da região cortical e subcortical (principalmente tálamo) (MILLIAN, 2003). (Figura 4)

**TABELA 3 – Níveis de processamento de ameaças e níveis relacionados de integração neuronal. FONTE: GRAY; MCNAUGHTON, 2000.**

<b>Nível de processamento</b>	<b>Comportamento</b>	<b>Substrato neural</b>
Perigo potencial (conflito aproximação X esquiva)	Avaliação de risco e inibição comportamental	Cingulado posterior, sistema septo- hipocampal
Perigo potencial (sem conflito; muitas vezes é condicionado)	Esquiva	Cingulado anterior e amígdala
Perigo distal	Fuga, inibição da agressão	Hipotálamo medial
Perigo proximal	Congelamento, fuga, luta	Substância cinzenta periaquedutal

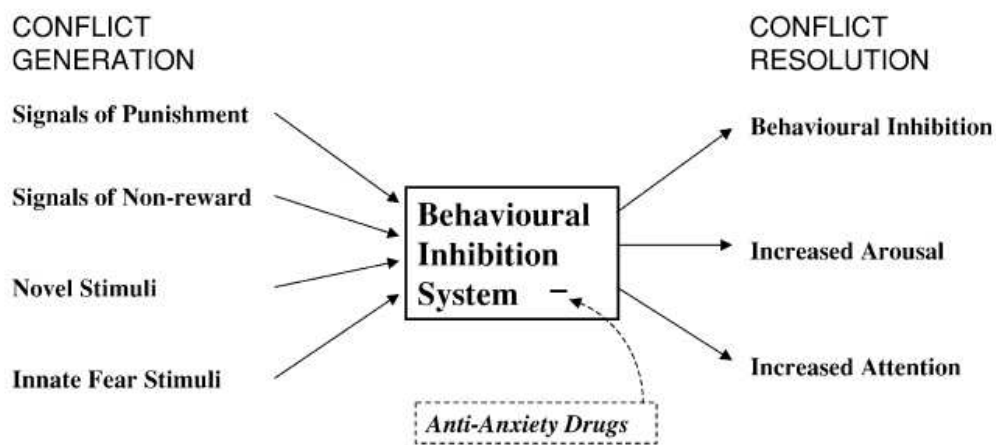


**Figura 4 - Representação esquemática da organização das estruturas envolvidas na integração e indução de estados ansiosos.** Abreviações: PF/F pré frontal/frontal; ENT entorrinal; CX córtex; MB (SMB) corpos mamilares (corpos supramamilares); CING cingulado; ASSN associação; THAL tálamo; INS insular; SS somatosensorial; STT trato espinotalâmico; DMV/NAMB núcleo motor dorsal do vago/núcleo ambíguo; HR frequência cardíaca; AP pressão arterial; LAT HYPOTH hipotálamo lateral; PVN núcleo paraventricular; ACTH hormônio adrenocorticotrófico; NRPC núcleo reticular pedunculocelular; PAG matéria cinzenta periaquedutal; FMN núcleo motor facial; VTA área tegmental ventral; LC locos ceruleus; DLTN núcleo segmentado dorsolateral; DA dopamina; ACh acetilcolina; NACC núcleo accumbens. FONTE: MILLIAN, 2003.

#### 1.7.4 Sistema de Inibição Comportamental (SIC) (GRAY; MCNAUGHTON, 2000)

O estudo dos efeitos de ansiolíticos clássicos sobre o comportamento de animais levou ao surgimento do conceito de “sistema de inibição comportamental”. Esse sistema controla a inibição do comportamento que está sendo executado, o aumento da vigilância, e o aumento da atenção. Esse controle pode ser produzido por estímulos associados a dor, punição, perda de recompensa, novidade e incerteza. Estudos com lesão levaram a considerar o sistema septo-hipocampal como sendo central no SIC. Essa hipótese é

também suportada pelo fato que drogas ansiolíticas diminuem o controle da atividade teta hipocampal. O sistema septo-hipocampal é composto pelo hipocampo, o giro denteado, córtex entorrinal, área subicular e córtex cingulado posterior. O sistema constituído pela formação hipocampal, área subicular e o circuito de Papez que circula a informação do subículo aos corpos mamilares, tálamo anteroventral, giro do cíngulo e de volta ao subículo, levaria em conta uma imagem do mundo exterior formada nos sistemas sensoriais neocorticais e trazida ao hipocampo pelo córtex entorrinal e via perfurante, os programas motores informados pelos gânglios da base e córtex pré frontal, os registros de memória de experiências que ocorreram em situações semelhantes e gera uma predição sobre o que vai acontecer no mundo exterior. Essa predição então é comparada, pelo subículo, com o estado do mundo exterior. Todo esse sistema é denominado sistema comparador, o qual operaria de dois modos. Quando a predição está de acordo com a realidade ele opera no modo de “checagem” e não influencia o comportamento. Quando a predição não está de acordo com o mundo real ele opera no modo de “controle” onde, toma conta do controle e leva à inibição comportamental.

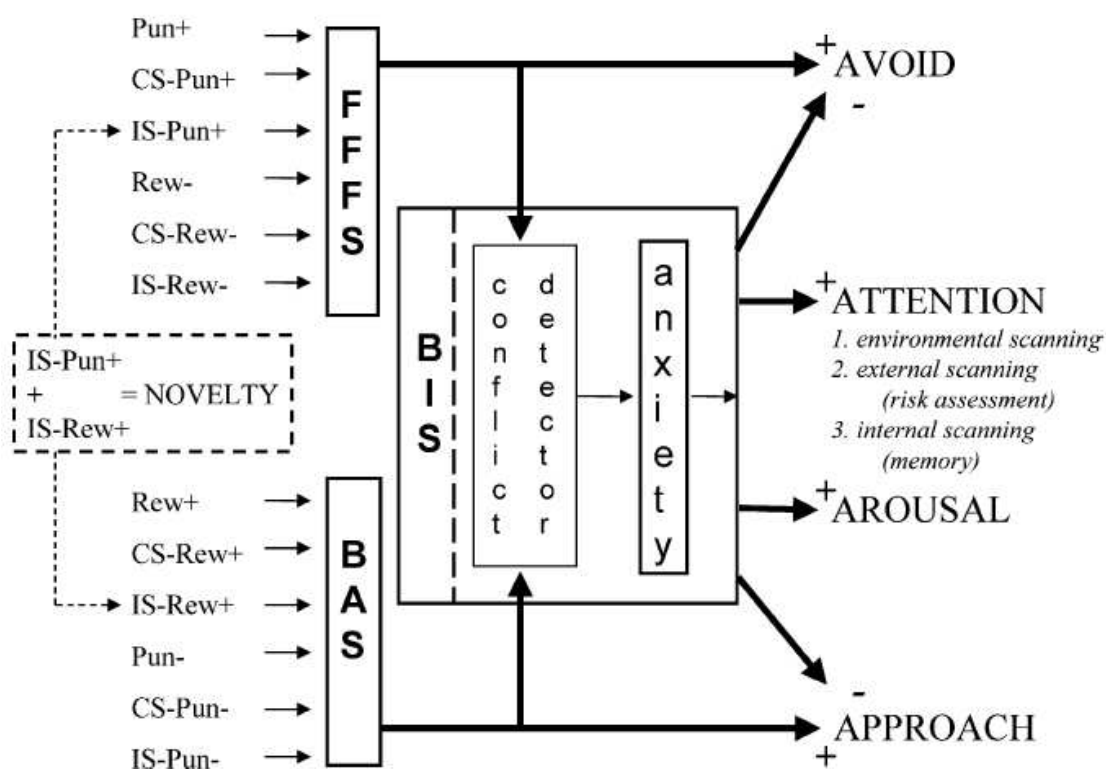


**Figura 5 - Sistema de inibição comportamental.** Esse sistema é ativado por estímulos geradores de conflito que estão representados do lado esquerdo e produz os comportamentos que estão do lado direito. Drogas ansiolíticas agiriam sobre esse sistema. FONTE: MCNAUGHTON; GRAY 2000

#### 1.7.5 Integração dos três sistemas (GRAY; MCNAUGHTON, 2000)

Na tentativa de integrar as teorias do sistema de defesa cerebral e do sistema de inibição comportamental houve uma mudança conceitual na

principal função do sistema septo-hipocampal. Ele passou a ser considerado um detector de conflitos entre tendências de aproximação e esquiva da fonte de perigo. A tendência à aproximação seria gerada pelo sistema de aproximação comportamental e o de esquiva pelo sistema cerebral de defesa. Sendo assim o SIC seria ativado quando existisse um conflito entre a aproximação e a esquiva, e a ansiedade poderia ser considerada como a ativação do SIC. Esse sistema fornece uma resolução preliminar quando existe o conflito aproximação/esquiva ao não permitir que nenhum dos objetivos conflitantes tome controle imediato sobre o comportamento. O aumento da vigilância é necessário para que se perceba alguma modificação entre os objetivos de aproximação/esquiva ou para escapar de algum perigo que se manifeste. O aumento da atenção aumenta a percepção do ambiente e os comportamentos de avaliação de risco.



**Figura 6 – Relação entre estímulo, sistema luta/fuga/congelamento (FFFS), sistema de aproximação comportamental (BAS) e o sistema de inibição comportamental (BIS).** Entradas são recompensas (Rew) ou punições (Pun) que podem ser apresentados (+) ou omitidos quando esperados (-) e de estímulos inatos (IS) ou estímulos condicionados (CS) que predizem esses eventos. FONTE: MCNAUGHTON e CORR 2004.

## 1.8 Modelos animais de ansiedade

### 1.8.1 Modelos não condicionados

#### 1.8.1.1 Teste do campo aberto ("*open-field*")

Consiste em uma arena circular, na maioria das vezes, com o chão quadriculado e fortemente iluminada e com a presença de um som de fundo contínuo e de baixa intensidade (WALSH; CUMMINS, 1976). O animal é colocado no centro da arena, por um período de tempo determinado, e o seu comportamento é observado. Hall (1934) usou o termo "emocionalidade" para descrever o que era avaliado pelo teste. A quantificação da ambulação do animal reflete o comportamento de resposta de medo, uma vez que o animal permanece imóvel ("*freezing*") quando é exposto a um estímulo estranho ou nocivo. Uma ativação do sistema nervoso autônomo leva, por consequência, a um aumento da defecação. Um animal "emocional" ou "medroso" apresenta baixa atividade motora e muita defecação no campo aberto. Ansiolíticos, como os benzodiazepínicos, em baixas doses, aumentam a ambulação de animais não familiarizados com o teste (CHRISTMAS; MAXWELL, 1970), apesar de drogas estimulantes motoras também aumentarem esta medida (CUNHA; MASUR, 1978). Quanto à incidência de defecação no campo aberto, diferentes tratamentos com drogas que interferem na motilidade intestinal podem alterar esta medida, sem qualquer relação com a "emocionalidade".

#### 1.8.1.2 Teste da placa com furos ("*holeboard*")

O aparelho proposto por Boissier e Simon (1964) consiste em um quadro de 40 cm<sup>2</sup> e 1,8 cm de espessura, com dezesseis furos de 3 cm de diâmetro igualmente espaçados entre si. O camundongo é colocado no centro do quadro, e cada introdução da cabeça nos furos ("*head dipping*"), assim como o tempo gasto neste comportamento, são quantificados durante um período fixo de tempo. As drogas ansiolíticas aumentam o número total e o tempo gasto neste comportamento (NOLAN; PARKES, 1973; FILE, 1976).

#### *1.8.1.3. Caixa de transição claro-escuro*

Crawley e Goodwin (1980) utilizaram o número de transições feitas pelo camundongo entre os dois compartimentos de uma caixa, como índice de ansiedade. Estes compartimentos consistem em uma câmara grande e fortemente iluminada contínua com uma outra menor e escura. Neste teste, a luz funciona como um estímulo ansiogênico, e existe um aparente conflito entre a motivação de explorar e a de evitar o compartimento claro do aparelho. Drogas que aumentam o número de transições claro-escuro, em doses que não elevam a atividade motora, são consideradas ansiolíticas.

#### *1.8.1.4. Interação social*

Apesar deste teste estar melhor fundamentado para ratos (FILE, 1980), também foi descrito o seu uso para camundongos (DE ANGELIS; FILE, 1979). Pares de animais machos apresentam uma redução no número de aproximações e de explorações através do comportamento de cheirar um ao outro, quando são expostos a uma arena não familiar, fortemente iluminada. Os ansiolíticos revertem a resposta inibitória sobre a interação social.

#### *1.8.1.5. Agressão induzida por isolamento*

O camundongo Swiss macho, isolado numa gaiola durante quatro semanas, passa a atacar um intruso colocado em sua gaiola-casa ou em uma arena. Esta resposta é inibida por ansiolíticos (VALZELLI, 1973).

#### *1.8.1.6. Teste de neofagia*

Quando um novo alimento ou bebida é apresentado para camundongos num ambiente não familiar, eles só consomem pequenas quantidades. Pequenas doses de ansiolíticos diminuem a latência para o primeiro contato e para a ingestão e aumentam o consumo total do alimento (SOUBRIÉ et al., 1975).

#### 1.8.1.7. Teste da escada (*“staircase”*)

O aparelho proposto por Thiébot et al, (1973) para ratos foi modificado por Misslin, Ropartz e Mandel (1975) e Simiand, Keane e Morre (1984) para camundongos. Consiste em uma câmara com cinco degraus (3 cm de altura, 10 cm de largura e 7,5 cm de profundidade) circundados por uma parede de 23 cm de altura. Uma luz de 100 watts, 25 cm acima da câmara, é a única fonte de luz da sala. O número de elevações ou *“rearings”* (levantar-se nas patas posteriores) e de degraus subidos são registrados durante três minutos. Drogas ansiolíticas reduzem os *“rearings”* em doses que não diminuem o número de degraus subidos. O teste não é sensível para drogas ansiogênicas.

#### 1.8.1.8. Labirinto em cruz elevado

Este teste foi desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1955), sendo posteriormente modificado e validado como um modelo de ansiedade para ratos (PELLOW et al., 1985) e para camundongos (LISTER, 1987). Este modelo, desde então, tem sido amplamente utilizado, por ser rápido, simples e sensível aos efeitos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas.

O aparelho consiste em um labirinto em forma de cruz (ou de Xis), elevado cerca de 50 cm do chão, com dois braços abertos e dois fechados, nas laterais e nas extremidades. O animal é colocado no centro da cruz, e é deixado livre para explorar durante um período determinado, normalmente cinco minutos. Dois índices de “ansiedade” são utilizados: a proporção de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, este último expresso em segundos ou em porcentagem do total do tempo gasto nos braços abertos e fechados. Também se quantifica o total de entradas nos quatro braços.

Animais não tratados com drogas, normalmente, evitam os braços abertos do labirinto, preferindo os fechados. Após receberem tratamento com ansiolíticos, os animais passam a evitar menos os braços abertos. Esta aversão pelos braços abertos apresenta várias propriedades que podem indicar uma situação provocadora de “medo” ou “ansiedade”. Pellow et al. (1985) demonstraram um maior aumento no nível plasmático de corticosterona após o

confinamento nos braços abertos do que nos fechados. Além disso, nos braços abertos, os animais defecam mais e realizam mais comportamento de auto-limpeza (“*grooming*”) (MCBLANE; HANDLEY, 1992).

Tem sido considerado (LISTER, 1990), que os estímulos aversivos presentes no modelo, incluem novidade, altura e espaços abertos. Treit, Menard e Royan (1993) estudaram, em ratos, a relevância destes três tipos de estímulos aversivos no labirinto. Eles demonstraram que não ocorre habituação ao medo pelo labirinto mesmo após dezoito sessões, ao contrário, os animais passaram a evitar ainda mais os braços abertos já na segunda sessão. Eles observaram que: o confinamento do animal nos braços abertos, durante três sessões de 30 minutos, não diminuiu a aversão por estes braços; a variação da altura do labirinto até o chão (de 50 cm até 6 cm) também não alterou a resposta de medo; a presença de paredes laterais transparentes nos “braços abertos” promoveu sua maior exploração. Diante destes dados, os autores, em concordância com outros (HANDLEY; MCBLANE, 1993), concluíram que o principal estímulo ansiogênico ou aversivo do labirinto, está representado pelo espaço aberto, ao invés da altura ou novidade como se pressupunha. Além disso, os autores também demonstraram que o efeito ansiolítico do diazepam, observado numa primeira exposição dos animais ao labirinto, desapareceu ao longo das três sessões subsequentes. Outros autores (LISTER, 1987a; FILE, 1990; FILE; MALBUTT; HITCHCOTT, 1990; RODGERS; LEE; SHEPHERD, 1992) também relataram que o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos era abolido quando os animais eram previamente expostos ao labirinto, tanto sob a ação destas drogas, como na sua ausência. Apesar destes dados todos se referirem a ratos, é pertinente considerar que também possam exercer papel importante em camundongos.

### *1.8.2 Modelos Condicionados*

#### *1.8.2.1 Teste das Quatro Placas*

Foi introduzido por Boissier et al (1968) e se baseia na supressão do comportamento de exploração de um ambiente novo. O aparato consiste de um chão feito de quatro placas de metal. Toda vez que o camundongo cruza de



uma placa para outra ele recebe um choque nas patas. Benzodiazepínicos aumentam o número de cruzamentos punidos aceitos pelo animal

#### *1.8.2.2 Sobressalto Potencializado pelo Medo*

Foi desenvolvido por Brown et al 1951 e envolve dois passos. (1) treinamento dos animais para associar um estímulo neutro, como uma luz, com um estímulo aversivo, como um choque. (2) Ao animal é apresentado um outro estímulo neutro não condicionado, como um som alto. O salto em resposta a esse estímulo é potencializado quando é apresentado junto com o estímulo condicionado. Ansiolíticos produzem uma redução na amplitude do salto sem redução na amplitude observada quando apenas o estímulo condicionado é apresentado.

#### *1.8.2.3 Teste de Conflito de Vogel*

Neste teste, desenhado por Vogel em 1971 animais com sede recebem água de um bebedouro sob a punição de receberem também um choque na língua. O “lamber” é suprimido nos controles e liberado por drogas ansiolíticas.

- 
- I. "Trait", long-term anxious states
    - (A) Rodent strains displaying high or low anxiety
    - (B) Inter-individual differences within a defined strain
    - (C) Chronic exposure to fear-provoking stimuli
    - (D) Genetic models: transgenic and knock-out mice
  - II. "State", acute anxious states
    - (A) Unconditioned
      - (1) Exploration (avoidance, conflict)
        - (i) Light-dark box (light chambers vs. dark chambers)
        - (ii) Holeboard (nose pokes)
        - (iii) Elevated plus-maze (open arms vs. closed arms)
        - (iv) Open field (central squares vs. peripheral squares)
        - (v) Neophobia/emergence test (novel object)
      - (2) Interaction based
        - (i) Active social interaction (unfamiliar rat pairs)
        - (ii) Resident intruder
        - (iii) Ultrasonic vocalization (separation induced)
      - (3) Acute response to aversive stimuli (environment or brain stimulation)
        - (i) Freezing
        - (ii) Ultrasonic vocalization
        - (iii) Startle
        - (iv) Autonomic-cardiovascular parameters (arterial pressure, heart rate, endocrine secretion)
      - (4) Defensive behavior to threatening stimuli
        - (i) Fear/defence battery
    - (B) Conditioned
      - (1) Conflict procedures
        - (i) Geller-Seifter (operant, lever-pressing for reward)
        - (ii) Vogel Conflict Test
        - (iii) Conditioned suppression (no punishment during test session)
        - (iv) Safety-signal withdrawal (no punishment during test session)
        - (v) Conditioned place aversion
      - (2) Non-conflict procedures
        - (i) Fear-induced freezing, startle and ultrasonic vocalizations (re-exposure to aversive environment)
        - (ii) Shock-probe (burying of aversive object)
      - (3) Drug-discrimination
        - (i) Anxiogenic agents

**Figura 7 – Modelos animais de ansiedade. FONTE: MILLIAN, 2003**

### **1.9 Relação Entre Etanol e Ansiedade em Humanos**

A convicção de que o álcool reduz a tensão ou ansiedade está muito difundida entre nós, assim como que o seu uso e abuso parecem ser reforçados por esta propriedade redutora de ansiedade. Quando Conger (1956) defendeu formalmente a teoria redutora da ansiedade ou tensão (TRT), causou grande impacto na pesquisa sobre álcool, e até os dias atuais, muitos estudos são realizados procurando testar esta hipótese (KALODNER; DELUCIA; URSPRUNG, 1989). Tanto os indivíduos que bebem socialmente como os que apresentam problemas com o álcool atribuem o uso à propriedade redutora da tensão, sendo esta atribuição mais prevalente entre os dependentes (EDWARDS, 1972; GOLDMAN; BROWN; CHRISTIANSEN, 1987). Terapeutas que tratam alcoolismo, também compartilham desta mesma visão (CAPPELL, 1975). Os teóricos do aprendizado tem sugerido que os efeitos do etanol reduzindo a ansiedade funcionem como um reforço negativo (WALKER, 1969). FARBER; KHAVARI; DOUGLASS (1980) verificaram que 93% de uma amostra de dependentes de álcool, justificavam o seu consumo em termos da redução da tensão, enquanto que indivíduos que bebem socialmente relatavam razões de celebração e sociabilidade.

Estudos com pacientes alcoolistas sugerem uma comorbidade com transtornos de ansiedade (25-45%), sendo fobia social e pânico com agorafobia as mais prevalentes (SMAIL et al., 1984). Por outro lado, as taxas de prevalência de alcoolismo em populações com transtornos de ansiedade variam de 15 a 40% (THYER et al., 1986; NOYES et al., 1992; STARCEVIC et al., 1992; MASSION; WARSHAW; KELLER, 1993).

Segundo SCHUCKIT (2006) as comorbidades entre dependência e outros transtornos psiquiátricos podem ocorrer de quatro modos. (1) essas comorbidades podem ocorrer como duas ou mais condições independentes, as quais provavelmente seguirão cursos clínicos distintos; (2) O primeiro transtorno pode influenciar o desenvolvimento do segundo transtorno de forma que o segundo transtorno segue então um curso independente; (3) o segundo transtorno pode surgir pela tentativa de aliviar os problemas associados ao primeiro transtorno; (4) alguns transtornos podem ser passageiros e causados pela intoxicação com vários tipos de substâncias. O tipo de comorbidade

presente em um paciente pode ter implicações no seu tratamento e curso clínico dos transtornos.

Num estudo epidemiológico realizado no EUA, Puerto Rico e Munique, Weissman (1988) relatou uma incidência de 10 a 15% de mulheres e de 5 a 8% de homens sofrendo de fobias simples; 8 a 9% de mulheres e 3 a 5% de homens com agorafobia; 1,9 a 2,9% de mulheres e 0,9 a 1,7% de homens com transtorno de pânico. Quanto à incidência de alcoolismo na população estudada, Weissman relatou que 25% dos homens e 2 a 4% das mulheres atingiram os critérios do DSM-III para abuso de álcool. Quanto à comorbidade entre desordens de ansiedade e alcoolismo, foi descrito que pessoas com fobias apresentavam um risco de alcoolismo cerca de 2,5 vezes maior do que pessoas da população geral. Também foi relatada uma co-segregação familiar de alcoolismo e transtornos de ansiedade. Weissman concluiu que o alcoolismo pode preceder, coexistir ou ser uma consequência da ansiedade.

Cox et al. (1994) relataram uma correlação negativa (-0,46) entre transtorno de pânico e abuso de álcool em pacientes homens, enquanto que aqueles com fobia social apresentaram uma maior prevalência de abuso de álcool (47%). Quanto às pacientes mulheres, estes padrões não foram encontrados.

Segundo Morris et al. (2005) vários estudos epidemiológicos tem demonstrado uma co-morbidade significativa entre transtorno de ansiedade social e problemas com o uso de álcool. Apesar de muitos trabalhos terem demonstrado fortes relações entre esse distúrbio de ansiedade e etanol, existe muita inconsistência para se demonstrar causalidade ou ate mesmo a direção na relação entre esses dois transtornos. Existem estudos mostrando relações positivas, negativas ou nulas entre esses transtornos.

Zimmermann et al (2004) encontraram que uma parcela importante dos pacientes com dependência química tem comorbidade com fobia social. Essa co-morbidade piora muito a morbidade dos transtornos por uso de drogas e também é muitas vezes associada com uma redução na resposta ao tratamento.

Schmidt et al (2007) acompanharam 404 pacientes durante dois anos e notaram que alta resposta de ansiedade era preditiva do desenvolvimento de problemas relacionados ao álcool, independentemente da ansiedade traço e da

historia de problemas relacionados a outras substancias. Um individuo com baixa resposta de ansiedade não interpreta sensações físicas relacionadas à ansiedade como sendo ameaçadoras, enquanto que indivíduos com alta resposta de ansiedade interpretam essa sensação como sendo indicadora de doenças, vergonha, perda de controle e outras consequências ruins.

Robinson et al (2009) estudaram o uso de álcool e outras drogas como forma de auto medicação para transtornos de ansiedade. A prevalência de auto medicação variou de 18,3% (auto medicação com álcool para transtorno de ansiedade generalizada) a 3,3% (auto medicação com álcool e outras drogas para fobia específica e transtorno do pânico com agorafobia). Sendo assim a auto medicação é um comportamento comum entre indivíduos da população geral com transtornos de ansiedade.

Terra et al (2006) estudaram transtornos de ansiedade em 300 pacientes hospitalizados por serem alcoolistas. A co-morbidade entre ansiedade e alcoolismo foi alta, sendo de 30,6% para fobia específica, 24,7% para fobia social, 22,2% para transtorno de ansiedade induzido por álcool, 19,3% para transtorno de ansiedade generalizada, 5% para transtorno obsessivo-compulsivo, 4,6% para estresse pós traumático e 2% para transtorno do pânico com agorafobia. A fobia social precedeu a dependência de álcool em 90,2% dos pacientes. E apenas 20,3% desses pacientes com fobia social e alcoolismo recebiam tratamento para fobia social.

Goodwin et al (2004) em um estudo longitudinal acompanharam cerca de 1000 crianças do nascimento aos 21 anos de idade. Foi encontrado um aumento no risco de dependência em jovens com transtornos de ansiedade. Porém essa associação parece não ser causal já que quando foi refeita a análise considerando-se como co-variadas os fatores: história familiar, comorbidade com depressão, uso anterior de outras drogas, entre outros, essa associação não foi mais notada.

Schuckit e Hesselbrock (1994) numa revisão da literatura desde 1975, concluíram que a interação entre o uso de álcool e transtornos da ansiedade é complexa. A análise dos dados disponíveis não prova esta relação, ao contrário, estudos prospectivos de filhos de alcoolistas e indivíduos da população em geral não indicam uma alta taxa de transtornos de ansiedade precedendo a dependência ao álcool. Estes autores discutem que as altas

taxas de co-morbidade de alguns estudos, provavelmente refletem uma mistura de transtornos de ansiedade reais entre alcoolistas numa taxa igual ou ligeiramente maior do que aquela para a população geral, juntamente com síndromes de ansiedade induzidas pelo álcool, temporárias e, às vezes, graves.

Vários trabalhos da literatura relatam a existência de perfis de personalidade determinantes da dependência ao álcool em homens e mulheres, e que seriam diferentes daqueles da população geral (STABENAU, 1984; 1990; HESSELBROCK; MEYER; KEENER, 1985; HAGNELL et al., 1986; BLANE; LEONARD, 1987; MALLOY et al., 1989; GROVE et al., 1990; HILL; ZUBIN; STEINHAUER, 1990; TARTER et al., 1990; LEWIS; BUCHOLZ, 1991; LISKOW et al., 1991; WHIPPLE; PARKER; NOBLE, 1991; BAU; SALZANO, 1995). Talvez o exemplo melhor documentado é para pessoas com diagnóstico de transtorno de personalidade antissocial, que se baseia num comportamento antissocial grave e gradual com início na infância ou adolescência e que continua até a fase adulta. Estes indivíduos são impulsivos, inábeis para aprender a partir dos seus erros e com dificuldade para estabelecer relacionamentos mais profundos. Quando são expostos ao álcool e outras drogas, apresentam uma probabilidade de 60% ou mais de atingir os critérios de abuso ou dependência, pelo menos para uma substância. Porém, existem dados indicando que apesar desta relação entre transtorno de personalidade antissocial e dependência de drogas, o alcoolismo e esta desordem de personalidade são problemas independentes (VAILLANT, 1983; STABENAU, 1984; 1990; GROVE et al., 1990; LISKOW et al., 1991). Além disso, o transtorno de personalidade antissocial não é muito comum (HELZER; PRYZBECK, 1988) e cerca de 85% ou mais dos alcoolistas não preenchem os seus critérios diagnósticos pelo DSM-III-R (eixo II).

Schuckit et al. (1994) realizaram um estudo onde os mesmos indivíduos foram avaliados aos 20 e 30 anos, quanto ao uso e dependência de álcool e medidas de características de personalidade (*Eysenck Personality Inventory*, *MMPI related scales*, *Rathus Assertiveness Schedule*, *Rotter Locus of Control Scale* e *Spielberger State-Trait Anxiety Inventory*). Os dados demonstraram que, exceto para o transtorno de personalidade antissocial, não foi possível

identificar nenhum perfil de personalidade, confiável, associado ao risco individual de alcoolismo.

Como exposto anteriormente, vários estudos testando a Teoria Redutora da Tensão (TRT) não foram capazes de comprová-la de maneira efetiva, quer através de levantamentos epidemiológicos sobre a ocorrência e co-morbidade de transtornos de ansiedade e alcoolismo, quer através de estudos da relação entre perfis de personalidade e alcoolismo.

Algumas outras considerações feitas por Kushner et al. (1994) a respeito da TRT, dizem respeito aos indivíduos que não consomem álcool. Eles argumentam que a TRT não é relevante para estes indivíduos por não ocorrer a contingência do reforço negativo especificada pela teoria. Também, entre indivíduos dependentes de álcool, a relevância da TRT pode levar a interpretações ambíguas. Por exemplo, algumas características da síndrome de dependência, tais como a presença de sintomas de abstinência e o uso compulsivo, podem exercer uma influência importante sobre o comportamento de ingestão de álcool em alcoolistas gerando ansiedade.

A susceptibilidade de uma pessoa aos processos da TRT pode ser modulada por fatores de diferença individual (BARON; KENNY, 1986). Marlatt (1979) sugeriu que indivíduos que tentam enfrentar seus afetos negativos ou outros problemas, escolhem a opção que eles acreditam ser a mais efetiva ou eficiente. Neste contexto, a ansiedade sozinha não é suficiente para levar a beber, mas a expectativa de que o álcool promoverá um alívio efetivo ou eficiente da ansiedade, é também necessária.

Kushner et al. (1994) avaliaram esta relação entre a expectativa de redução da ansiedade e o uso de álcool em uma amostra de estudantes. Eles relataram que os estudantes homens com alta expectativa de redução de tensões pelo álcool, mostraram uma correlação fortemente positiva entre as medidas de ansiedade e o comportamento de beber. Este padrão não foi encontrado para as mulheres.

Parece que homens e mulheres demonstram padrões diferentes na interrelação estresse e ansiedade, consumo de álcool e expectativa para os efeitos do álcool. Além disso, as mesmas expectativas para os efeitos do álcool podem levar a comportamentos diferentes, dependendo do valor que cada um atribui às expectativas. Por exemplo, mulheres que enfrentam situações

indutoras de ansiedade (encontros heterossexuais, interações estressantes com crianças, etc.) podem associar os efeitos redutores de tensão do álcool com perda de controle, vulnerabilidade aumentada ou irresponsabilidade. Os homens, podem não valorizar as reduções na responsabilidade e as inibições associadas com a redução na tensão induzida por álcool. Estas interpretações atingem a esfera de ambiente social a que homens e mulheres estão inseridos.

Estudos avaliando o papel do ambiente social sobre o efeito ansiolítico do álcool, também são relatados. Os meios físico e social nos quais o álcool é consumido influenciam a frequência e a quantidade de consumo, assim como os efeitos da intoxicação. Wilson, Perold e Abrams (1981) relataram que homens que bebiam socialmente e que acreditavam que uma mulher que eles queriam impressionar numa interação social, também estava alcoolizada, mostraram-se menos ansiosos, do que aqueles que acreditavam que ela estava sóbria. Em outros trabalhos (LANGENBUCHER, 1985; STEELE; JOSEPHS, 1988) foi descrito que se uma pessoa realizasse uma atividade neutra ou prazerosa enquanto bebia, ocorria redução de estresse, e se a atividade fosse desagradável, ocorria aumento deste.

Del Porto e Masur (1984) relataram que voluntários que consumiram álcool em grupo, ficaram "eufóricos" e consideraram o efeito prazeroso, enquanto que quando sozinhos, descreveram o efeito do álcool como indiferente.

A influência da expectativa do efeito do álcool num indivíduo não é apenas evidenciada quando respostas subjetivas são esperadas (ansiedade, euforia, prazer), mas também para respostas objetivas como prejuízo motor. Fillmore e Vogelsprott (1995) submeteram indivíduos que ingerem o álcool socialmente, a uma tarefa motora no laboratório, com ou sem a presença de doses moderadas de álcool (0,35 g/kg). O grau de alteração no desempenho dos indivíduos, foi medido durante uma sessão com álcool e, posteriormente, numa outra sessão, a mesma medida foi realizada, mas administrando-se placebo ao indivíduo que esperava receber álcool. Os autores relataram que nos indivíduos que esperavam maior prejuízo no desempenho motor, foi observada uma grande piora, tanto sob o efeito do álcool como sob o do placebo. Esta evidência mostra a importância das expectativas como um fator



que pode contribuir para a compreensão das diferenças individuais do comportamento em resposta ao álcool.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar se o padrão basal de ansiedade exibido no teste do labirinto em cruz elevado influencia a resposta ao efeito ansiolítico do etanol e o padrão de consumo de etanol em camundongos submetidos a um modelo de adição.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Caracterizar camundongos quanto ao seu perfil comportamental no teste do labirinto em cruz elevado numa situação sem droga e após administração aguda e crônica de etanol;

Caracterizar camundongos quanto ao seu perfil comportamental no teste do labirinto em cruz elevado numa situação sem droga antes de submetê-los ao modelo de adição;

Caracterizar os diferentes padrões de consumo de etanol apresentados pelos camundongos expostos ao modelo de adição.

## **3-JUSTIFICATIVA**

O alcoolismo é um problema social que afeta milhões de pessoas e ainda não se conhecem quais são os fatores responsáveis pela transição do beber controlado para o descontrolado. A compreensão desses fatores pode fornecer subsídios para uma melhor abordagem terapêutica.

## 4-MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

No total foram utilizados 500 camundongos machos Swiss adultos provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Inicialmente foram usados 300 animais para o experimento 1. No experimento 2 foram testados 200 animais dos quais foram selecionados 77 para o experimento 3. Os restantes foram aproveitados em outros experimentos do laboratório. Nos experimentos 1 e 2 os animais eram mantidos em grupos de 20 em caixas de 50cm X 30cm X 15cm. Durante a exposição ao modelo de adição, os animais foram isolados em gaiolas de plástico medindo 20x30x20 cm e mantidos em sala com temperatura controlada de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob ciclo claro-escuro de 12 horas e alimentação *ad libitum*.

### 4.2. Equipamentos

#### 4.2.1. Caixa de Movimentação Espontânea

Construída com aço escovado e acrílico, consiste em uma caixa medindo 60x20x30 cm, com três paredes em aço e uma (anterior) em acrílico transparente escuro. O assoalho é formado por barras de aço de 0,5 cm de diâmetro separadas entre si por 1 cm, e o teto de aço (tampa removível). O animal foi colocado no centro da caixa e permaneceu na caixa por 3 minutos. Três células fotoelétricas registraram o número de interrupções do feixe luminoso, quando o animal se movimenta no interior da caixa, registrando o número de ambulações. (Figura 8)

#### 4.2.2 Labirinto em Cruz Elevado

Construído em madeira e pintado com tinta óleo cor preta, elevado 50 cm do piso, apresentando dois braços abertos e opostos medindo 50x10 cm cada, e cruzados perpendicularmente por outros dois braços do mesmo tamanho, porém fechados nas suas três faces externas com paredes de 40 cm de altura. Possui uma área central de  $10\text{cm}^2$  delimitada pelos quatro braços. A

iluminação da sala de 1,5 m x 1,5 m é feita por uma lâmpada vermelha de 40 watts colocada a 120 cm acima do labirinto. Os camundongos foram colocados individualmente na área central do labirinto e observados por 3 minutos, sendo a latência para entrar em um dos braços cronometrada. O tempo de permanência tanto no braço aberto como no braço fechado foi cronometrado. O número de entradas nos braços aberto e nos fechados foi contado. Foi considerada uma entrada quando o animal colocar as quatro patas em um dos braços do labirinto. Também foi contado o número de protusões da cabeça para fora da borda dos braços abertos (*head dippings*). O tempo em que o animal permaneceu na área central do aparelho não será cronometrado. (Figura 9)

#### 4.2.3 Campo Aberto

Construído com piso de madeira e paredes de aço escovado com 50 cm de altura delimitando uma área circular de 1 m de diâmetro sendo o assoalho pintado de branco, subdividido com linhas pretas traçadas através de dois círculos concêntricos com várias linhas radiais formando figuras semelhante a trapézios com aproximadamente 15cm e 20 cm nos lados. A um metro acima do assoalho há quatro lâmpadas de 100 watts cada. Cada animal foi colocado no centro da arena e o seu comportamento quantificado durante 3 minutos. Os parâmetros registrados foram os seguintes: número de “trapézios” invadidos na área central (ambulação central) e na periferia (ambulação periférica), o número de *rearing* e os tempos de *freezing*, de *grooming* e de latência para o animal abandonar inicialmente o centro da arena. (Figura 10)

#### 4.3. Drogas

No experimento 1 foi utilizado etanol absoluto P.A. (Laboratório Merck) diluído em solução salina 0,9% para a concentração de 10% (p/v) e administrado intraperitonealmente (i.p.) na dose de 2g/kg. Solução salina 0,9% i.p. foi administrada em volume correspondente à dose de etanol. No experimento 3 foi utilizado etanol 95% P.A. (Laboratório Vetec) diluído em água nas concentrações de 5 e 10% (v/v) e administrado por via oral (v.o.) *ad libitum*.

Durante a fase de adulteração, as soluções de etanol foram misturadas com 0,005 g/L de cloreto de quinino, dose escolhida de uma curva dose resposta na qual se avaliou a aversividade ao sabor amargo pelas doses de 0,001, 0,005, 0,01 e 0,05 g/L de quinino (FACHIN-SCHEIT, 2006).



**Figura 8 – Caixa de movimentação espontânea.**



**Figura 9 - Labirinto em cruz elevado.**

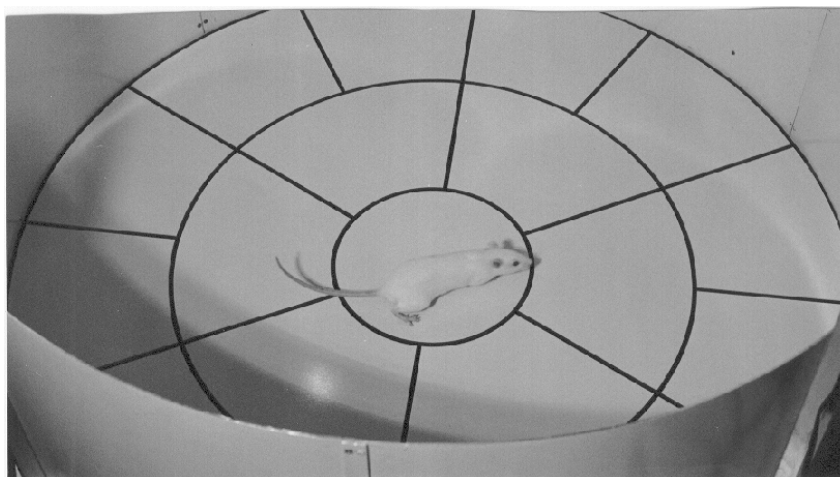
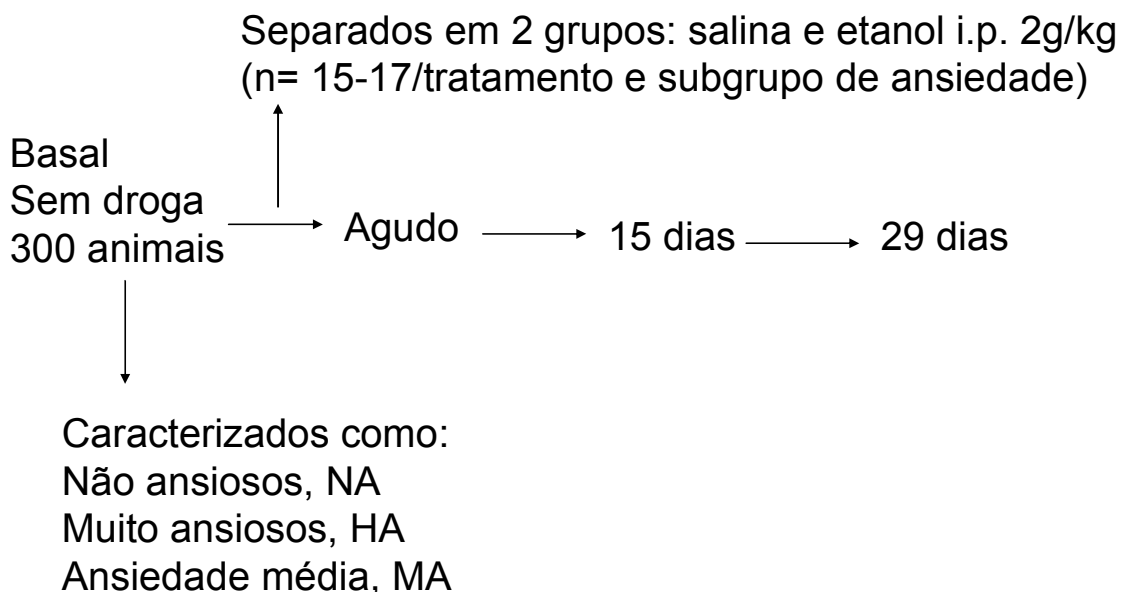


Figura 10 – Campo Aberto.

#### 4.4. Procedimento

##### 4.4.1 *Experimento 1: Caracterização dos camundongos durante múltiplas exposições ao LCE sem droga e sob efeito do etanol*

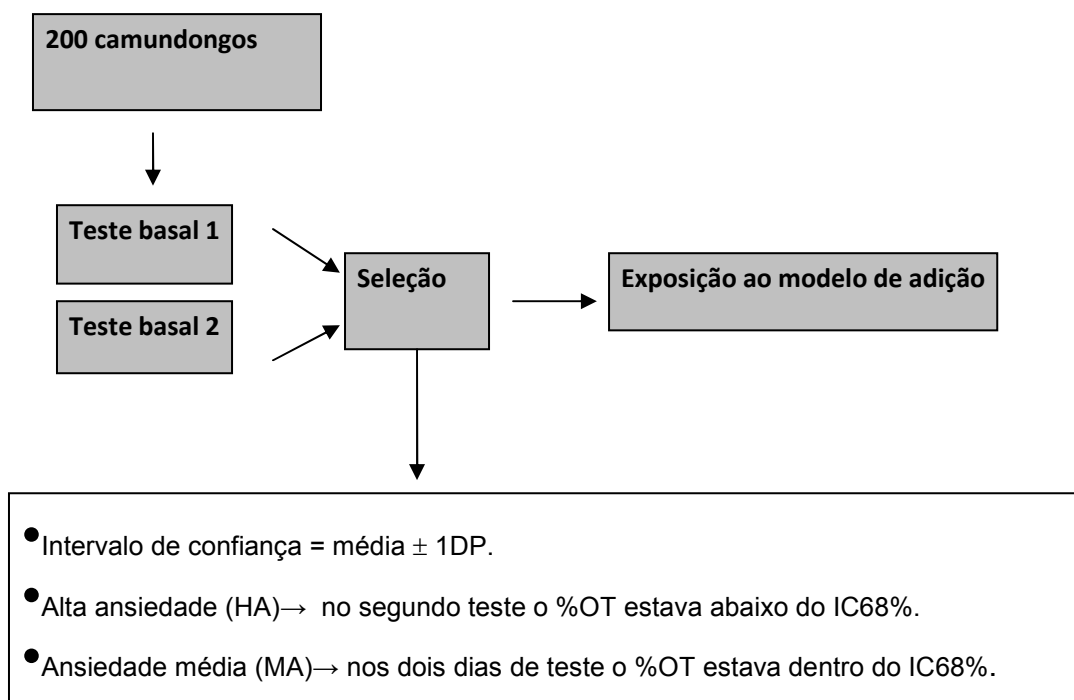
Trezentos camundongos foram expostos ao labirinto em cruz elevado por três minutos (primeiro teste, basal - B). A média (53,5%) e o desvio padrão (17,5%) do percentual de tempo no braço aberto (OT%) foram calculados e então, o intervalo de confiança de 68% foi também calculado ( $IC\ 68\% = média \pm 1DP$ ). Com os valores do IC eles foram classificados em: não ansiosos, NA (16% da amostra:  $\%OT > 71\%$ ), muito ansiosos, HA (21% da amostra:  $\%OT < 36\%$ ) e ansiedade média, MA (47% da amostra:  $36\% \leq \%OT \leq 71\%$ ). Cada grupo de ansiedade foi subdividido para receber diariamente salina i.p ou etanol 2g/kg ( $n = 15-17$ /tratamento e subgrupo de ansiedade). Eles foram novamente testados no labirinto em cruz elevado em três situações: administração aguda (7 dias após teste basal) e após 15 e 29 dias de administração crônica. (Figura 11)



**Figura 11 – Procedimento geral do experimento 1.**

#### *4.4.2 Experimento 2: Caracterização dos camundongos como alta ansiedade e ansiedade média*

Os 200 camundongos após ambientação por 5 dias, passaram por duas avaliações basais, com intervalo de 1 semana entre elas, antes do início do tratamento por livre escolha. Os animais foram expostos à caixa de movimentação espontânea, ao labirinto em cruz elevado e ao campo aberto em ordem aleatória durante 3 minutos em cada aparelho para uma avaliação comportamental basal. As duas exposições dos animais tiveram como objetivo detectar os animais que apresentavam um perfil de ansiedade mais estável (traço de ansiedade). Vinte e quatro horas após a segunda exposição, os animais foram acondicionados em suas gaiolas individuais e expostos ao tratamento por livre escolha. Esses mesmos testes comportamentais realizados inicialmente foram repetidos, 5 horas após a retirada das soluções de etanol na fase de abstinência. (Figura 12)



**Figura 12 – Procedimento geral do experimento 2.**

#### 4.4.3 Experimento 3: Modelo de Adição

Um grupo com 59 camundongos (HA=29, MA=30) foram isolados em gaiolas individuais e submetidos a um período de 70 dias (**10 semanas- Fase de Aquisição**), com livre acesso às soluções de etanol 10% e 5% e água. Um grupo controle com 20 camundongos (n=8 HA e n=10 MA) tiveram acesso somente à água.

Em seguida, as soluções de etanol foram retiradas por **2 semanas** deixando somente água disponível - **Fase de Abstinência**.

Uma avaliação comportamental nos testes do labirinto em cruz elevado, campo aberto e caixa de movimentação espontânea, foi realizada 5 horas após a retirada das soluções de etanol - **Teste na Abstinência**. O grupo controle também passou pelos testes comportamentais novamente. Após a avaliação comportamental retornaram às gaiolas e continuaram o regime de abstinência.

A próxima fase durou mais **2 semanas - Fase de Reapresentação** - na qual as soluções de etanol foram novamente oferecidas.



Por último, na **Fase de Adulteração** que durou mais **2 semanas**, as soluções de etanol foram adulteradas com 0,005 g/L de quinino para propiciar um sabor amargo aversivo. Nada foi adicionado à água.

Durante todo o experimento, as posições das garrafas foram mudadas a cada dois dias e o consumo dos líquidos medidos volumetricamente, sendo que as soluções eram descartadas e repostas nestas ocasiões. (Figura 13)

Após todo o procedimento do modelo de adição, os 59 animais foram classificados em grupos: adicto, pesado e leve de acordo com seu padrão individual de consumo nas diferentes fases, que está sumarizado a seguir:

#### Consumidor adicto

- Preferência pela solução etílica ou sem preferência.
- Sem redução significativa do consumo de etanol (g/kg) na fase de adulteração comparado com a livre escolha.

#### Consumidor pesado

- Preferência pela solução etílica ou sem preferência.
- Consumo de etanol (g/kg) alto, porém com redução significativa durante a adulteração quando comparado com a livre escolha (todos).

#### Consumidor leve

- Preferência pela água em todas as fases.
- Consumo de etanol (g/kg) baixo, podendo até ter um aumento significativo nas fases posteriores à abstinência.

#### 4.4.4 Cálculo da Quantidade de Álcool Consumido em Gramas/Kg/Dia

O volume de álcool diário consumido no decorrer do tratamento foi convertido em gramas de álcool por kg de peso do animal, aplicando-se a fórmula abaixo. Os coeficientes utilizados foram calculados a partir da densidade do álcool.

$$Q \text{ (g/kg/dia)} = (V_{10\%} \times 0,075 + V_{5\%} \times 0,0375) / P \times 1000$$

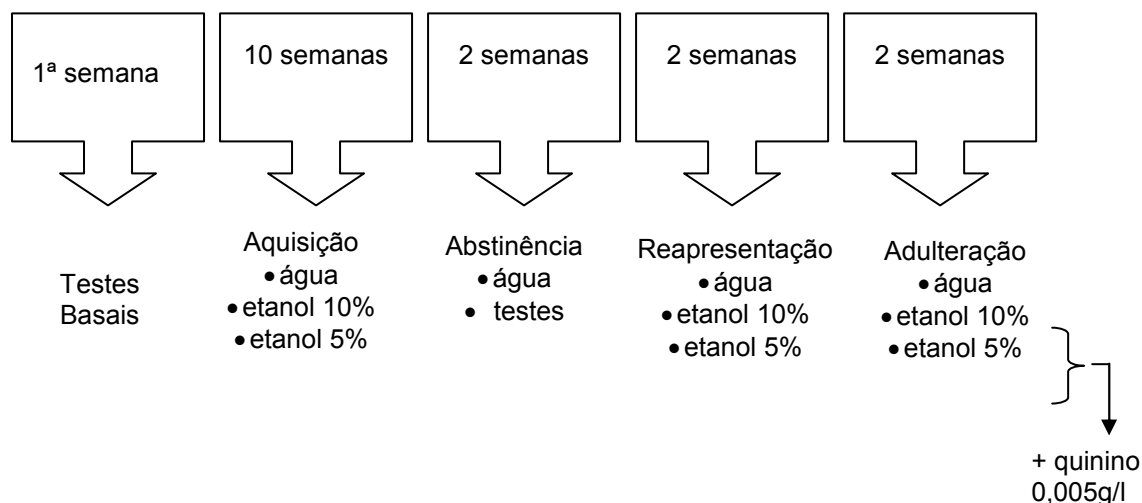
Q = quantidade de álcool consumida diariamente em g/kg de peso do animal

V10% = volume consumido diariamente da solução de etanol a 10% (V/V)

V5% = volume consumido diariamente da solução de etanol a 5% (V/V)

P = peso do animal, em gramas, avaliado semanalmente.

#### Grupo Etanol (HA n=29, MA n=30)



#### Grupo Controle (HÁ n=8, MA n=10)

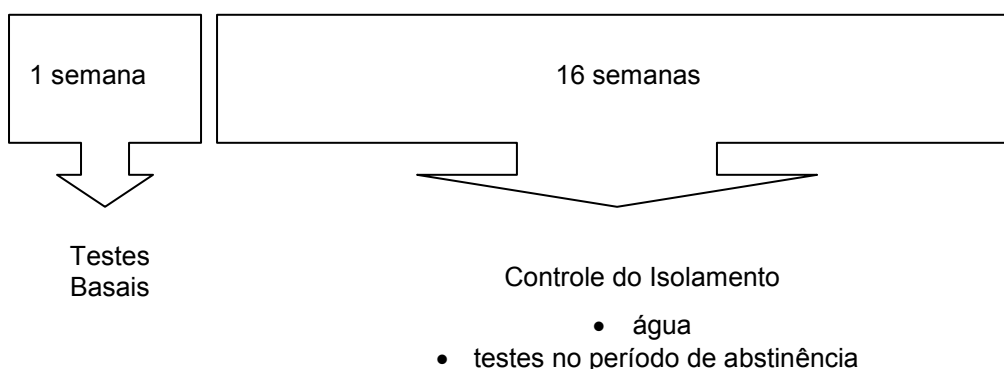


Figura 13 – Procedimento geral do experimento 3.

### 4.5 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados com relação a sua normalidade e homogeneidade de variância. No experimento 1 foi feita uma ANOVA de três vias tendo como variável dependente a % tempo no braço aberto e como fatores, “nível de ansiedade” “tratamento” e “ocasião de teste”. O teste post-hoc utilizado foi o de Newmann-Keuls. Nos experimentos 1 e 2 os intervalos de confiança 68 % (média  $\pm$  desvio padrão) foram usados para classificar os

animais de acordo com o percentual do tempo gasto por eles no braço aberto. No experimento 3, para se classificar cada animal como adicto, pesado ou leve, foi feita uma ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste de Newmann-Keuls no intuito de se comparar o consumo de etanol (em g/kg/dia, usando-se a fórmula explicada acima) nas diferentes fases do modelo. Foi feito um teste t para medidas independentes para se comparar o volume (mL) de água com o volume (mL) de etanol consumidos na fase de livre escolha, a fim de se estabelecer a preferência do animal. Para se comparar o consumo dos grupos no decorrer do modelo de adição, foi realizada uma ANOVA de três vias tendo como variável dependente o percentual de etanol consumido em relação ao volume total de líquido consumido e como fatores “padrão de consumo de etanol”, “nível de ansiedade basal” e “fase do modelo de adição”. Devido à falta de homocedasticidade entre os percentuais de tempo no braço aberto nos três testes as próximas análises foram não-paramétricas. Foi feita uma análise de correlação de Spearman para se analisar a relação entre o percentual de tempo no braço aberto e consumo de etanol durante as fases de aquisição e adulteração. Outra correlação de Spearman foi feita para se analisar a relação entre o percentual de tempo no braço aberto no segundo e terceiro testes. O teste de Mann Whitney foi usado para se comparar o percentual de tempo no braço aberto obtido nos três testes para os animais de alta e média ansiedade. O teste de Friedman seguido pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas foi usado para se comparar o percentual de tempo no braço aberto para cada grupo ao longo do tempo. O teste do Qui-quadrado foi usado para se comparar os grupos considerando-se a proporção de animais em cada padrão de consumo e ansiedade. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$  para todos os testes. Todas as análises foram realizadas com o programa STATISTICA 6.1 (Statsoft).

## 5. RESULTADOS – ARTIGO

Trait anxiety and ethanol: anxiolysis in high-anxiety mice and no relation to intake behavior in an addiction model

***Diego Correia <sup>a</sup>, Andrea Frozino Ribeiro <sup>b</sup>, Ana Lúcia Brunialti Godard <sup>b</sup>,***

***Roseli Boerngen-Lacerda <sup>\*a</sup>***

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, CEP 81531-990; Brazil

<sup>b</sup> Department of General Biology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 31270-901, Brazil

Correspondence and reprint requests to: Roseli Boerngen-Lacerda, P.O. Box 19031, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil. Tel: +55 (41) 3361-1720; Fax: +55 (41) 3266-2042. E-mail: [boerngen@ufpr.br](mailto:boerngen@ufpr.br)

## 1. Introduction

Factors that may contribute to the initiation of ethanol consumption and/or continued ethanol use are high basal levels of anxiety and increased anxiety associated with ethanol withdrawal (Bibb and Chambless, 1986; Breese et al., 2005; Cappell and Herman, 1972; Cornelius et al., 2003; Koob, 2003; Schuckit and Hesselbrock, 1994).

A recent retrospective and prospective study (Marquenie et al., 2007) of more than 7,000 Europeans showed that alcohol dependence was associated with high rates of lifetime anxiety. Moreover, anxiety generally preceded the development of alcohol use disorders. Another large-scale, international study investigating patterns of comorbidity between substance use and psychiatric disorders in six nations in the Americas, Europe, and Japan also suggested that the presence of an anxiety disorder may predispose an individual to the development of alcohol use disorders (Merikangas et al., 1998). Human laboratory studies have corroborated these findings. For example, Fox et al. (2007) demonstrated that in treatment-seeking alcohol-dependent people, exposure to stress imagery significantly increased alcohol craving, anxiety, and negative emotions. Sinha et al. (2006) also reported that higher levels of stress-induced cocaine craving were associated with a shorter time to relapse and that stress-induced levels of adrenocorticotrophic hormone and cortisol predicted higher amounts of cocaine used per occasion over a 90-day follow-up period. Animal studies demonstrated that the acquisition stage (i.e., the first time that an animal comes into contact with a drug and its rewarding properties) is modulated by glucocorticoids. In rats, an association has been demonstrated between high circulating corticosterone levels and operant self-administration of psychostimulant drugs (Piazza et al., 1994; Piazza and Le Moal 1996). However, the effects of glucocorticoids and stress during the acquisition phase of alcohol exposure have not been studied as systematically as during the acquisition phase for psychostimulants. Fahlke (1994a, b, 1995) described the increased voluntary drinking of ethanol after administration of corticosterone and the decreased voluntary drinking of ethanol after corticosterone inhibition or adrenalectomy in rats. These studies raise the possibility of a causal link between anxiety and vulnerability to the development of drug use disorders.

Alcohol use disorders have been associated with exposure to both internal and external stressors (Sinha, 2007). External stress, such as an unhappy marriage or job dissatisfaction, has been associated with increased alcohol use and alcohol use disorders. Moreover, in alcohol-dependent people, external stress is an important precipitant of relapse (Sinha et al., 2006; Noone et al., 1999). Internal stress states (e.g., anxiety) also can be associated with alcohol use. Researchers have long sought to explain why various forms of stress may precede the development of alcohol use disorders and precipitate relapse. Even before it was studied systematically, this association was first explained by the tension reduction hypothesis proposed by Conger (1956). According to this hypothesis, certain individuals who are innately anxious and more sensitive to the anxiolytic effects of ethanol may have a higher predisposition to drink or abuse ethanol, and the reduction of negative feelings by alcohol drinking may represent an important reinforcing effect (i.e., negative reinforcement). Many studies using a variety of experimental strategies have demonstrated that alcohol can dampen the stress response and anxiety in humans (Dai et al., 2007; Kushner et al., 1996; Sayette, 1999; Sinha et al., 1998; Sloan et al., 2003) and animals (Spanagel et al., 1995; Stewart et al., 1993; Wilson et al., 2003).

Substantial evidence in the literature points to an association between anxiety/stress and increased ethanol consumption. Different stressors may influence ethanol consumption depending on the lines and strains of animals and on the type, intensity, and duration of the stressor (Vengeliene et al., 2003; Chester et al., 2004; McKenzie-Quirk and Miczek, 2008; Pacak and Palkovits, 2001). To understand the genetic component of the relationship between anxiety and alcohol intake, some rodent models have been used, but these studies are limited, and their results have not been conclusive. Such studies have demonstrated positive (Colombo et al., 1995; Möller et al., 1997; Spanagel et al., 1995; Stewart et al., 1993; Izidio and Ramos, 2007), negative (Fernández-Teruel et al., 2002; Henniger et al., 2002; Tuominen et al., 1989; Viglinskaya et al., 1995), or null (Da Silva et al., 2004) associations between these two behavioral traits. Another question arising in the interpretation of these studies involving selective breeding or inbreeding is whether high-drinking

lines exhibit greater ethanol-reinforced behavior than low-drinking lines. Some other intervening variables, such as anxiety (Pohorecky, 1991) or novelty-seeking (Cloninger et al., 1988), have also been speculated to be related to excessive drinking. Furthermore, other variables, such as avoidance of ethanol taste, may interfere with oral measures of ethanol reinforcement, mainly in rats.

Furthermore, some animal studies may lack many aspects of human alcoholism, such as compulsive drug use, which is characteristic of addiction and is central to the diagnosis of dependence (American Psychiatric Association, 1994). Addiction is defined as compulsive drug use despite negative consequences. In recent years, new animal models have been developed and proposed for the study of compulsive drug use (craving or persistent desire for drug), relapse, and loss of control, which are specific components of human addiction (Heyman, 2000; Phillips, 2002; Shippenberg and Koob, 2002; Spanagel, 2003). The animal model utilized in the present study is based on an oral three bottle free-choice procedure that allows the study of alcohol-intake behavior. This animal model was proposed initially by Wolffgramm and Heyne (1995) for rats and validated for mice in our laboratory and has been shown to have face validity, reliability, and predictive validity when tested with naltrexone as a pharmacological challenge (Fachin-Scheit et al., 2006). The addictive behavior, defined as “loss of control over the ingestion of alcohol,” can be examined in this model when ethanol solutions are made aversive by the addition of a quinine solution. The “addicted” mice maintain their ethanol consumption despite the aversiveness of the quinine-adulterated alcohol solutions, while “non-addicted” animals substantially reduce their consumption.

Considering the controversy on the relationship between voluntary ethanol consumption and anxiety-like behavior in animals, the lack of concrete evidence proving this association in humans and the inconclusive data concerning the study of the influence of trait anxiety levels on the development of addiction in animal models, the present study investigated whether the different trait anxiety levels could influence (*i*) the anxiolytic-like effect of ethanol and (*ii*) the drinking patterns exhibited by genetically heterogeneous mice subjected to an addiction model.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

Initially, 500 locally bred, naive, male Swiss mice weighing 20-30 g and aged 45 days at the beginning of the experiment were housed in groups of 20-25 per cage (50 × 30 × 15 cm). The experiment began after a 1-week acclimation period in the experimental room. During the development of the addiction model (Experiment 3), mice were housed individually in cages measuring 20 × 30 × 20 cm. Mice were maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2°C) with a 12 h light/dark cycle (lights on at 0700 h). Food was available *ad libitum* (Purina Laboratories, Curitiba, Brazil). The animals were weighed weekly. All animal maintenance, care, and treatment procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

### 2.2. Apparatus and procedure

The elevated plus maze was made of black painted wood and arranged in a plus shape with two open arms facing each other. Walls (40 cm high) enclosed the other two arms. The arms measured 5 × 30 cm and were raised 50 cm above the floor. One red lamp was placed above the maze. At the beginning of a trial, the mouse was placed in the center of the maze facing one of the open arms and allowed to explore the maze for 3 min. During this period, the number of entries and the time spent in the open and closed arms were recorded. A mouse was considered to have visited the arm when all four paws were on that arm. From these variables, percent open arm time (%OT) was calculated as  $100 \times \text{time spent on the open arms} / 180$ . %OT represents “fear/anxiety-like behavior.” The maze was carefully wiped with a damp cloth after each animal’s test. The tests were performed in the afternoon (between 1300 and 1800 h). All procedures were performed in accordance with Boerngen-Lacerda and Souza-Formigoni (2000).

### 2.3. Drugs



For Experiment 1, the animals received absolute ethanol (Merck) diluted in 0.9% NaCl to a 10% (w/v) concentration administered intraperitoneally (i.p.) at a dose of 2 g/kg 10 min before testing while the anxiolytic effects of ethanol are present (Middaugh et al., 1989; Boerngen-Lacerda and Souza-Formigoni, 2000). For Experiment 3, ethanol solutions of 10% and 5% (v/v) were prepared for oral administration by diluting 95% ethanol pro analysis (Vetec Laboratories, Taboão da Serra, São Paulo, Brazil) with tap water every other day (to control for ethanol evaporation). Adulterated ethanol solutions were prepared with 0.005 g/L of quinine hydrochloride.

## 2.4. Experimental procedure

### 2.4.1. Experiment 1: Characterization of mice during multiple exposures to the elevated plus maze in a drug-free state and after ethanol challenge

Three hundred naive mice were exposed to the elevated plus maze for 3 min (1st test, Basal [B]). The mean value (53.5%) and standard deviation (17.5%) of %OT were calculated by considering all mice. A confidence interval (CI68%) was then calculated ( $CI = \text{mean} \pm 1SD$ ). Mice were then characterized as non-anxiety (NA, 16% of the sample: %OT > 71%), high-anxiety (HA, 21% of the sample: %OT < 36%), and medium-anxiety (MA, 47% of the sample:  $36\% \leq \%OT \leq 71\%$ ). Mice were then distributed to receive daily i.p. saline or 2 g/kg ethanol ( $n = 15-17/\text{treatment}$  and subgroup of anxiety level) and again exposed to the same test under the same conditions (i.e., acute administration, 7 days after the drug-free test; 15 and 29 days of chronic administration). The goals of this experiment were to determine how characterization of anxiety levels in the elevated plus maze could be used in our experimental conditions and how mice with different anxiety levels would respond to a low, acute or chronic, doses of ethanol.

#### 2.4.2. Experiment 2: Characterization of mice as high-anxiety and medium-anxiety

Two hundred naive mice were exposed to the elevated plus maze for 3 min (1st test). Seven days later, mice were again exposed to the same test under the same conditions (2nd test). The mean value and standard deviation of %OT were calculated by considering all mice, and then a confidence interval (CI) was calculated ( $CI = \text{mean} \pm 1SD$ ). Mice were classified as HA when, during the 2nd test, their %OT was below the lower limit of the corresponding CI. Mice were classified as MA when, during the 1st and 2nd test, their %OT was within the range of the corresponding CI.

#### 2.4.3. Experiment 3: Chronic free-choice ethanol procedure (addiction model)

Thirty mice characterized as MA and 29 as HA from Experiment 2 were housed individually and exposed to a free-choice procedure for 10 weeks (acquisition phase [AC]), during which they had free access to 10% and 5% ethanol (v/v) and water. The positions of the bottles were changed on alternate days when fluid intake was measured volumetrically. Over the next 2 weeks, only tap water was provided (withdrawal phase [W]). Approximately 5 h after ethanol withdrawal, drug-free animals were subjected to the elevated plus maze to measure their anxiety indices. During the following 2 weeks, the ethanol solutions were again offered to establish free-choice responding among the ethanol solutions and water (reexposure phase [RE]). At the end of this period, the ethanol solutions were adulterated with 0.005 g/L quinine, creating an aversive, bitter-tasting solution, which was offered to the animals for a further 2 weeks (adulteration phase [AD]). Control groups ( $n = 8$  HA,  $n = 10$  MA) only had access to water.

At the end of this experiment, mice were allocated to groups using the following criteria: addicted (A; significant preference for ethanol during all phases and the maintenance of ethanol consumption, with no significant decrease in consumption, during the AD phase), heavy drinker (H; significant preference for ethanol during the AC phase and a significant decrease in

ethanol consumption during the AD phase compared with the AC phase), and light drinker (L; significant preference for water during all phases). The animals that did not conform to any of these patterns were excluded from subsequent analyses. A detailed description of the entire procedure and analysis can be found in Fachin-Scheit et al. (2006).

## 2.5. Statistical analysis

All data were analyzed for normality and homogeneity of variance. In Experiment 1, three-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used, with three factors, Anxiety Level, Treatment, and Test Occasion, followed by Newman-Keuls multiple range test. In Experiments 1 and 2, the confidence intervals (mean  $\pm$  SD) were used to classify mice according to their basal %OT. In Experiment 3, body weight in grams and ethanol intake in milliliters were used to compute grams of ethanol intake per kilogram of body weight per day (g/kg/day). To classify mice into groups as Addicted (A), Heavy (H), and Light (L), repeated-measures ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test was used to compare ethanol consumption during different phases for each mouse. The t-test for independent samples was performed to compare water (mL) and total ethanol intake (mL) during the acquisition phase for each mouse to obtain preference scores for ethanol and water. These data and respective analyses used for classification are not presented here but were used to classify mice into their respective groups (for detailed descriptions, see Fachin-Scheit et al., 2006). Ethanol consumption was expressed as the daily average percentage of total ethanol intake relative to total liquid intake and standard error of the mean (SEM) for the classified groups. A three-way repeated-measures ANOVA was used to compare this consumption throughout the self-administration procedure with the factors Ethanol Consumption Pattern, Basal Anxiety Level, and Addiction Model Phase. Spearman Correlation analysis was performed to analyze the relationship between %OT and ethanol consumption during the acquisition and adulteration phases of the free-choice procedure. Spearman Correlation analysis was also used to analyze the relationship between %OT measured during the 2nd and 3rd tests. Mann Whitney test was used to compare the %OT for the high-anxiety and medium-anxiety groups obtained during each of the three test sessions. Wilcoxon Matched Pairs test

was used to compare the %OT for each group over test occasions. The  $\chi^2$  test was used to compare groups by considering the proportion of animals in each intake pattern and anxiety level. The level of significance was set at  $p < 0.05$  for all comparisons. The data in Fig. 1 and 2 are expressed as means and SEM. For Fig. 3 and 4, individual values are presented. All analyses were performed using STATISTICA 6.1 (Statsoft).

### 3. Results

#### 3.1. Experiment 1: Characterization of mice during multiple exposures to the elevated plus maze in a drug-free state and after ethanol challenge

Fig. 1 shows that the ethanol effect differed according to the basal anxiety levels of the mice. The three-way ANOVA performed for %OT revealed statistically significant main effects of Anxiety Level ( $F_{2,85} = 15.057$ ,  $p \leq 0.001$ ), Treatment ( $F_{1,85} = 13.573$ ,  $p \leq 0.001$ ), and Test Occasion ( $F_{3,255} = 5.424$ ,  $p \leq 0.002$ ). Significant interactions were also observed for Anxiety Level  $\times$  Treatment ( $F_{2,85} = 3.302$ ,  $p \leq 0.05$ ), Treatment  $\times$  Test Occasion ( $F_{3,255} = 5.322$ ,  $p \leq 0.002$ ), and Anxiety Level  $\times$  Test Occasion ( $F_{6,255} = 11.742$ ,  $p \leq 0.001$ ). No significance was found for the Anxiety Level  $\times$  Treatment  $\times$  Test Occasion interaction ( $F_{6,255} = 1.050$ ,  $p > 0.05$ ). Non-anxiety mice exhibited decreased %OT over test days, regardless of treatment. Medium-anxiety mice, both saline- or ethanol-treated, maintained their %OT values over test days. Only high-anxiety mice showed an anxiolytic-like effect of ethanol, both acutely and after 29-day treatment. The high-anxiety, saline-treated mice generally maintained their %OT over test days.

#### 3.2. Experiment 2: Characterization of mice as high-anxiety and medium-anxiety

The mean value and standard deviation of %OT, considering all mice, during the 1st test was  $50.2 \pm 9.8$  and during the 2nd test  $35.7 \pm 12.3$ . The confidence intervals (CI68%) were 40.4 to 60 and 23.4 to 48, respectively. Mice were classified as HA ( $n = 37$ ) when, during the 2nd test, their %OT was below the lower limit of the corresponding CI. Mice were classified as MA ( $n = 96$ ) when, during the 1st and 2nd test days, their %OT was within the range of the

corresponding CI (but 40 mice were randomly chosen to be represented in Fig. 4 and to be used in Experiment 3).

The individual %OT values obtained during the 1st and 2nd tests in the elevated plus maze for HA ( $n = 37$ ) and MA ( $n = 40$ ) mice are presented in Fig. 4A. The figure also shows the %OT for each mouse exposed to the elevated plus maze during the withdrawal phase of the addiction model (3rd test). These data are presented later with the data from mice classified according to their intake patterns.

### 3.3. Experiment 3: Chronic free-choice ethanol procedure (addiction model)

Mice exposed to the free-choice paradigm were classified into three groups according to their individual water or ethanol drinking patterns: addicted (A,  $n = 23$ ), heavy (H,  $n = 13$ ), and light (L,  $n = 16$ ). Ethanol consumption (mean g/kg/day  $\pm$  SD) for Group A was  $9.8 \pm 2.5$  (AC phase),  $8.5 \pm 2.3$  (RE phase), and  $10.4 \pm 2.6$  (AD phase). For Group H, ethanol consumption was  $13.9 \pm 3.1$  (AC phase),  $8.3 \pm 1.7$  (RE phase), and  $9.0 \pm 2.4$  (AD phase). For Group L, ethanol consumption was  $5.3 \pm 2.3$  (AC phase),  $5.5 \pm 1.8$  (RE phase), and  $6.5 \pm 2.5$  (AD phase).

Considering their basal anxiety levels, mice were classified as HA-Addicted ( $n = 10$ ), MA-Addicted ( $n = 13$ ), HA-Heavy ( $n = 7$ ), MA-Heavy ( $n = 6$ ), HA-light ( $n = 8$ ), and MA-Light ( $n = 8$ ). From the seven remaining mice, one died, and the other six (four from the HA group and 2 from the MA group) did not meet classification criteria (e.g., one mouse preferred water during the AC phase and ethanol during the AD phase), and these animals were excluded from further analysis.

The three-way ANOVA performed for percent total ethanol intake relative to total liquid intake revealed statistically significant main effects of Ethanol Consumption Pattern ( $F_{2,46} = 40.767$ ,  $p \leq 0.001$ ) and Addiction Model Phase ( $F_{2,92} = 10.251$ ,  $p \leq 0.001$ ) and a significant Ethanol Consumption Pattern  $\times$  Addiction Model Phase interaction ( $F_{4,92} = 6.318$ ,  $p \leq 0.001$ ). No significant effects were found for Basal Anxiety Level ( $F_{1,46} = 0.246$ ,  $p = 0.62$ ) or the Basal Anxiety Level  $\times$  Ethanol Consumption Pattern interaction ( $F_{2,46} = 0.432$ ,

$p = 0.65$ ), Basal Anxiety Level  $\times$  Addiction Model Phase interaction ( $F_{4,92} = 0.691$ ,  $p = 0.50$ ), or Basal Anxiety Level  $\times$  Addiction Model Phase  $\times$  Ethanol Consumption Pattern interaction ( $F_{4,92} = 0.489$ ,  $p = 0.74$ ).

Fig. 2 shows that Groups A and H, both HA and MA, consumed more ethanol than Group L, both HA and MA, during all phases ( $p \leq 0.05$ ). In phases RE and AD, Group H, both HA and MA, exhibited significantly lower ethanol consumption than that exhibited during the AC phase ( $p \leq 0.01$ ). Comparisons among phases showed that Group A maintained its high ethanol consumption during all phases ( $p > 0.05$ ). Group L showed consistently low ethanol intake during all phases ( $p > 0.05$ ).

Fig. 3 presents the correlation between ethanol intake during the AC phase (left) or AD phase (right) and the %OT evaluated before animals, grouped according to their basal anxiety levels, were exposed to the addiction model (2nd test, open circles) and during the withdrawal phase (3rd test, filled circles). No significant correlations were found between %OT (2nd and 3rd tests, respectively) and ethanol intake for the HA group in the AC phase ( $r_{2nd} = 0.30$ ,  $r_{3rd} = 0.25$ ; Fig. 3A) and AD phase ( $r_{2nd} = -0.004$ ,  $r_{3rd} = 0.39$ ; Fig. 3B) and for the MA group in the AC phase ( $r_{2nd} = -0.14$ ,  $r_{3rd} = 0.03$ ; Fig. 3C) and AD phase ( $r_{2nd} = 0.06$ ,  $r_{3rd} = -0.0004$ ; Fig. 3D). All  $p$  values were greater than 0.05.

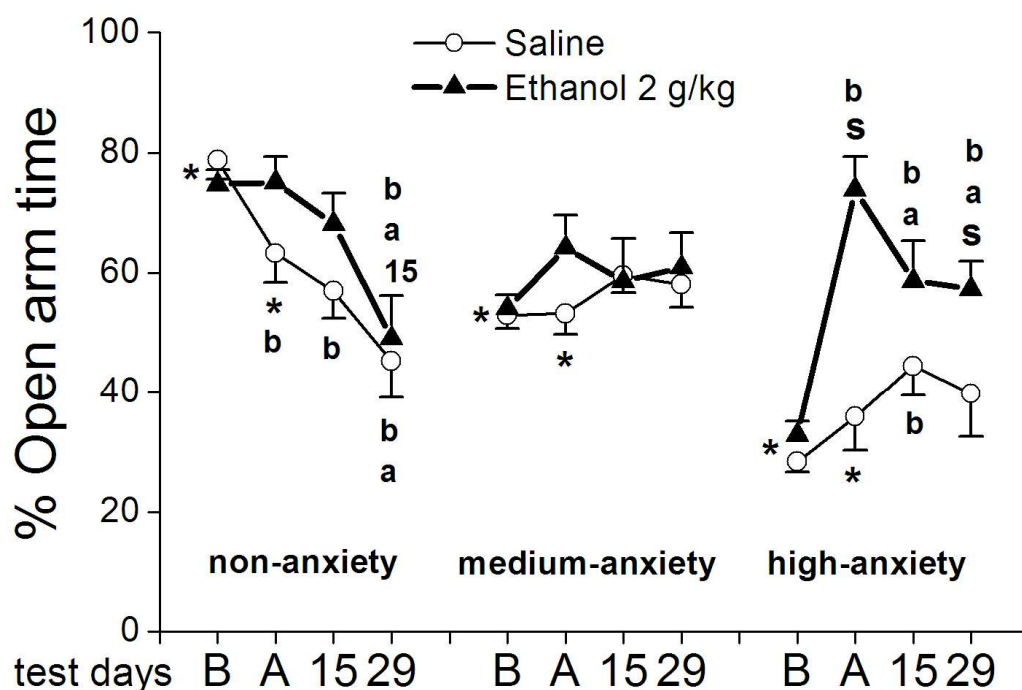
Fig. 4 presents the %OT obtained during three exposures to the elevated plus maze (1st and 2nd tests before exposure to the addiction model and 3rd test performed during the withdrawal phase) for each animal from Group A (Fig. 4B), Group H (Fig. 4C), Group L (Fig. 4D), and the control group (Fig. 4E). Fig. 4A shows all mice ( $n = 77$ ) selected from Experiment 2 and grouped according to their basal anxiety levels. This figure shows that HA mice had a lower median %OT compared with MA mice during the three occasions ( $U_{1st} = 384.5$ ,  $U_{2nd} = 3.00$ ,  $U_{3rd} = 442.0$ ,  $p < 0.05$ ). Comparisons among the three tests showed that %OT decreased over tests in both groups ( $\chi^2_{2MA} [n = 40, df = 2] = 49.7$ ,  $1st > 2nd > 3rd$ ;  $\chi^2_{2HA} [n = 37, df = 2] = 45.8$ ,  $1st > 2nd$  and  $3rd$ ).

Considering the groups separately, %OT obtained during the 2nd test was significantly higher for MA mice for all groups ( $U_A = 0$ ,  $p < 0.0001$ ;  $U_H = 0$ ,  $p < 0.002$ ;  $U_L = 0$ ,  $p < 0.001$ ;  $U_C = 0$ ,  $p < 0.0004$ ). Significantly higher %OT was

observed in MA mice during the 1st test for Group H ( $U_H = 0$ ,  $p < 0.002$ ) and during the 3rd test for Group L ( $U_L = 12.0$ ,  $p < 0.04$ ), but all MA groups exhibited higher %OT than HA groups during all test occasions. Comparisons among the three test occasions showed that %OT decreased significantly over tests in Group A ( $\chi^2_{MA} [n = 13, df = 2] = 19.1$ ,  $1st > 2nd > 3rd$ ;  $\chi^2_{HA} [n = 11, df = 2] = 17.6$ ,  $1st > 2nd$  and  $3rd$ ), Group L ( $\chi^2_{MA} [n = 8, df = 2] = 9.7$ ,  $1st > 2nd$  and  $3rd$ ;  $\chi^2_{HA} [n = 8, df = 2] = 9.3$ ,  $1st > 2nd$  and  $3rd$ ), and in the control group ( $\chi^2_{MA} [n = 10, df = 2] = 12.7$ ,  $1st > 2nd > 3rd$ ;  $\chi^2_{HA} [n = 10, df = 2] = 13.9$ ,  $1st > 2nd$  and  $3rd$ ). No significant difference was observed for Group H, possibly because it contained the lowest number of animals.

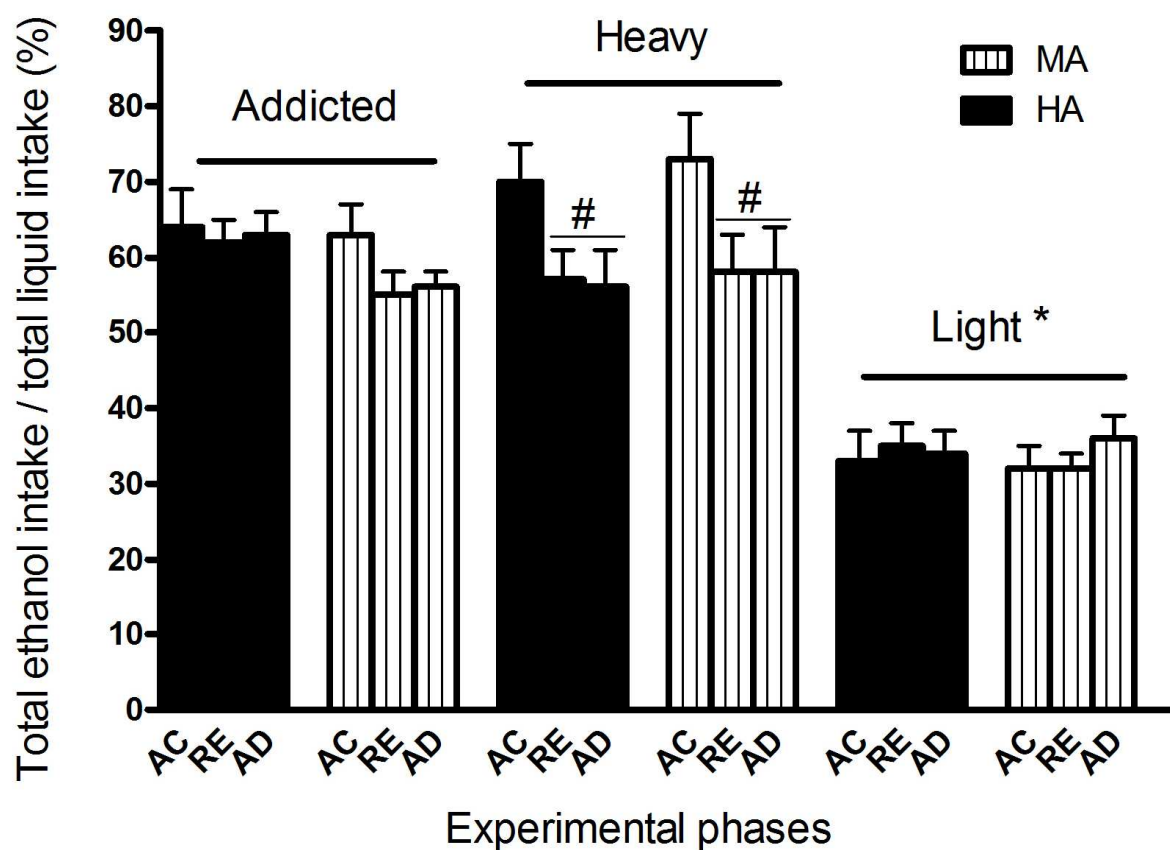
The correlation indices obtained between %OT during the 2nd and 3rd tests were the following: Groups A-MA ( $r = 0.71$ ), Group A-HA ( $r = 0.25$ ), Group H-MA ( $r = -0.23$ ), Group H-HA ( $r = 0.46$ ), Group L-MA ( $r = 0.31$ ), Group L-HA ( $r = 0.11$ ), Control-MA ( $r = 0.54$ ), and Control-HA ( $r = -0.06$ ). Only Group A-MA reached statistical significance ( $p < 0.05$ ).

These last data take into account the proportions of MA or HA mice in each intake pattern. No significant differences were observed among proportions. In Group A, 43% were HA and 57% MA ( $\chi^2 = 0.78$ ,  $p = 0.38$ ). In Group H, 54% were HA and 46% MA ( $\chi^2 = 0.15$ ,  $p = 0.69$ ). In Group L, 50% were MA and 50% HA ( $\chi^2 = 0$ ,  $p = 1.0$ ).



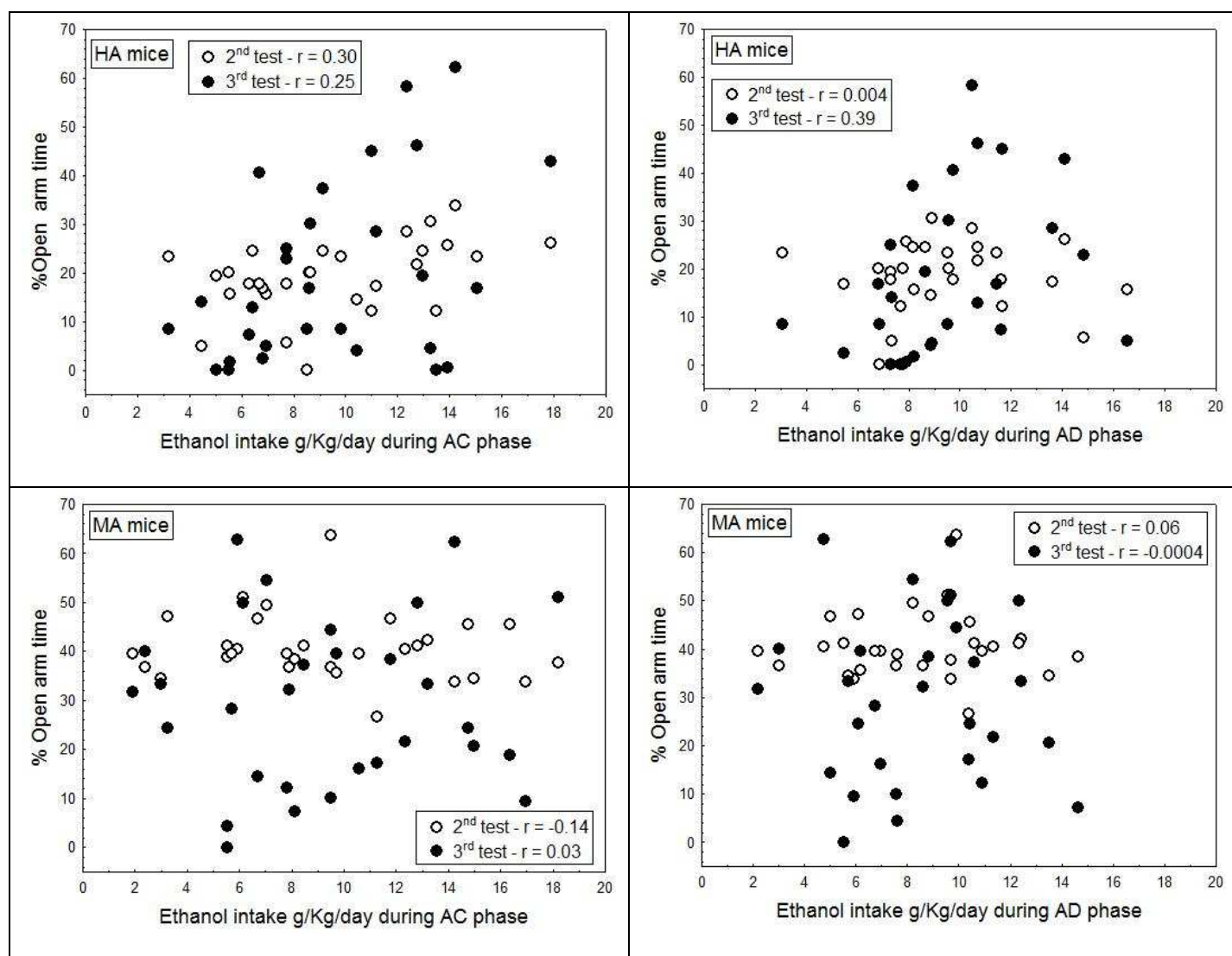
**Figure 1. Effect of ethanol on anxiety-like behavior in the elevated plus maze in mice with different basal anxiety levels.** The effects of 2 g/kg ethanol (filled triangles) or saline (open circles) (i.p.) on percent open arm time in mice characterized as non-anxiety ( $n = 17$  for saline,  $n = 17$  for ethanol), medium-anxiety ( $n = 17$  for saline,  $n = 17$  for ethanol), and high-anxiety ( $n = 15$  for saline,  $n = 16$  for ethanol). Lines represent mean  $\pm$  SEM of percent open arm time evaluated in the following conditions in the elevated plus maze: drug-free test (B), after the first-day treatment (A), after 15 days of daily treatment (15), and after 29 days of daily treatment (29). Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) are indicated by the following symbols: s, different from saline-treated group; b, different from basal test (drug-free); a, different from acute treatment test; 15, different from 15th day treatment test; \*, different from the other group in the same condition (ANOVA followed by Newman-Keuls).



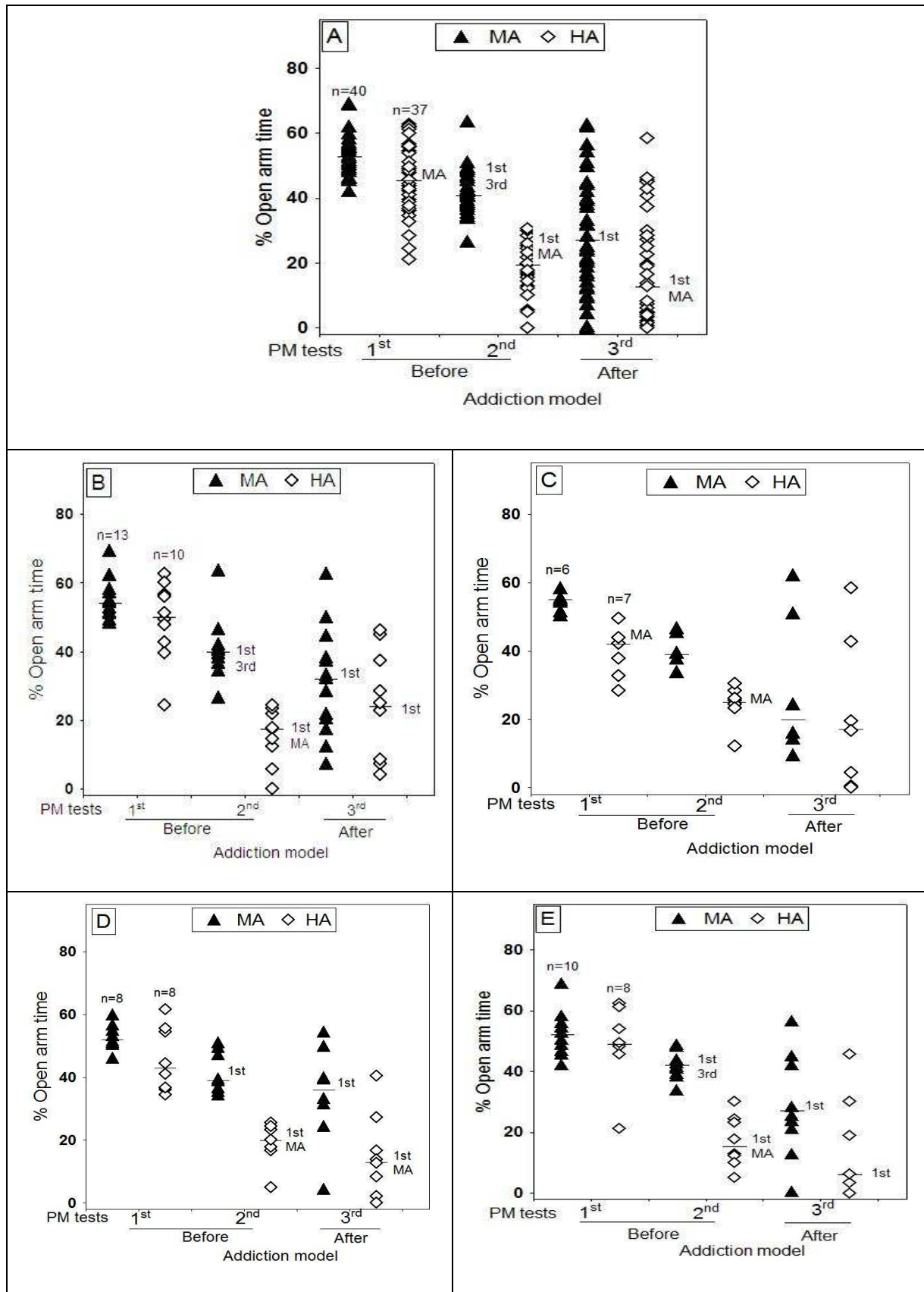


**Figure 2. Preference for ethanol during different phases of the self-administration model.**

Percent ethanol intake during each of the experimental phases (AC, last 2 weeks of the acquisition phase; RE, 2 weeks of the reexposure phase; AD, 2 weeks of the adulteration phase) for the addicted, heavy, and light groups subdivided as high-anxiety (HA,  $n = 10$  for A,  $n = 7$  for H,  $n = 8$  for L) and medium-anxiety (MA,  $n = 13$  for A,  $n = 6$  for H,  $n = 8$  for L). Bars represent mean  $\pm$  SEM of the percent total volume of ethanol intake relative to total fluid intake. Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) are indicated by the following symbols: \*, different from the other groups; #, different from the AC phase (ANOVA followed by Newman-Keuls).



**Figure 3. Correlations between anxiety indices and ethanol consumption.** Correlations between ethanol consumption (g/kg/day) during the acquisition phase (left) or adulteration phase (right) and the percent open arm time evaluated in the elevated plus maze before exposure to the addiction model (2nd test, open circles) and the percent open arm time evaluated in the elevated plus maze 5 h after ethanol withdrawal in the withdrawal phase (3rd test, filled circles). The two upper panels show the high-anxiety mice, and the bottom two panels show the medium-anxiety mice. Each dot represents an animal. No significant Spearman correlation was observed ( $p > 0.05$ ).



**Figure 4. Anxiety-like behavior evaluated on three occasions in the elevated plus maze in groups with different patterns of ethanol intake and different basal anxiety levels - Individual representation of the percent open arm time evaluated in the elevated plus maze on**

two occasions before exposure to the addiction model (1st and 2nd tests with 7-day interval) and 5 h after ethanol withdrawal during the withdrawal phase (3rd test) for the medium-anxiety mice (▲) and high-anxiety mice (◇). The upper panel (A) shows all 77 mice characterized in Experiment 2, and the other panels show each group characterized as (B) addicted, (C) heavy-drinker, (D) light-drinker, and (E) control group, totaling 70 mice. From the remaining seven mice, one died and the other six had unstable intake patterns. In all tests, mice were drug-free. The small horizontal lines represent the median percent open arm time for each group on each of the three test occasions. Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) are indicated by the following symbols: 1st, different from the 1st test for the same group; 3rd, different from the 3rd test for the same group (Wilcoxon test); MA, different from the medium-anxiety group on that occasion (Mann-Whitney test).

#### 4. Discussion

The main objective of the present study was to verify whether anxiety and ethanol addiction are related. As mentioned above, the tension reduction hypothesis (Conger, 1956) postulates that “certain individuals who are innately anxious and more sensitive to the anxiolytic effects of ethanol might show a higher predisposition for ethanol drinking and abuse, so that the reduction of negative feelings by drinking alcohol might represent an important reinforcing effect (negative reinforcement).” We conducted Experiment 1 to verify whether mice with different basal responses in the elevated plus maze would exhibit an anxiolytic-like effect of ethanol. Interestingly, we observed that only high-anxiety mice (i.e., those exhibiting initially low %OT) consistently had such an effect. Furthermore, these mice maintained their profile as high-anxiety over the four tests, whereas the non-anxiety mice changed their profile over tests, reaching the same anxiety levels as high-anxiety mice during the last test. Therefore, the high-anxiety mice were adequate for testing the tension reduction hypothesis. Considering the number of animals necessary for selecting different profiles and conducting the study using the addiction model, the high-anxiety mice had displayed the most stable anxiolytic response to ethanol and high-anxiety mice also displayed the most stable anxiety profile, suggesting a possible “trait” anxiety, we decided to study the relationship between anxiety levels and ethanol intake in the addiction model, which was previously validated in our laboratory, using high-anxiety and medium-anxiety mice.

Some authors distinguish personality-based (temperament), sustained, “trait” anxiety from ephemeral, fear-induced “state” anxiety. Experimentally,

“trait” anxiety may be modeled by (i) genetically modified lines of mice, (ii) chronic stress exposure, (iii) highly “anxious” strains of mice or rats, and (iv) inherent differences in anxiety-like behavior between individual animals of a common strain. In fact, considerable efforts have been valuably invested in the characterization of strains displaying differential responsiveness to stress and contrasting patterns of anxiety-like behavior. Nevertheless, somewhat disappointing is that individual intra-strain differences have received little attention insofar as neither animal nor human populations are homogeneous in terms of “basal” levels of anxiety and the response to anxiolytic agents. Indeed, individual disparities among animals are obviously heuristically relevant to the striking differences seen among (“healthy”) humans with regard to their responsiveness to stress and anxiety-like behavior (Millan, 2003). The present study demonstrated that outbred mice, characterized for their different basal levels of anxiety, showed differential responsiveness to the anxiolytic-like effect of ethanol, highlighting the importance of considering individual behavioral differences in a heterogeneous population of mice.

Another interesting finding was the persistence of the anxiety profile during all of the elevated plus maze evaluations observed in Experiments 1, 2, and 3, which suggested that mice were characterized by a “trait” anxiety profile. Importantly, one can see that during the 3rd exposure to the elevated plus maze (i.e., 5 h after ethanol withdrawal during the withdrawal phase of the addiction model), mice continued to exhibit different anxiety profiles. Holmes and Rodgers (1998) suggested that the emotional response of rodents to the elevated plus maze alters as a function of prior test experience. Male Swiss-Webster mice were exposed to the elevated plus maze for 5 min on each of 3 consecutive days. Analysis of full session profiles (i.e., 5 min total scores) showed that a single prior undrugged experience on the maze increased behavioral indices of anxiety and that these alterations were either maintained or further enhanced on subsequent trials. Furthermore, the behavioral profile evident by trial 3 was largely unchanged when animals were reexposed to the maze 10 days later. More detailed (i.e., minute by minute) examination of behavior patterns within and between trials demonstrated that unambiguous open arm avoidance was acquired by the third minute of trial 1 and that the behavioral profile evident by the end of trial 1 was (i) markedly different than that seen at the beginning of the

trial, and (ii) was generally maintained or even accentuated on trials 2 and 3. Therefore, after the second exposure to the elevated plus maze, a stabilization of the animal's profile seemed to occur. Our data from Experiments 1 and 2 corroborate this possibility. Andreatini and Bacellar (2000) evaluated mice twice in the elevated plus maze and observed that the test/retest reliability of the measures obtained in the maze was low. Goes et al. (2009) exposed rats once to each of two models, including the free-exploratory paradigm, which is hypothesized to be a trait anxiety test, and the elevated plus maze, which is hypothesized to be a state anxiety test. The authors found a low correlation between the two tests. Noteworthy is that we used a large sample of mice to allow for differentiations between different profiles, whereas the majority of the previous studies used small and heterogeneous samples, which may have masked the influence of basal individual variability.

In 1995, Spanagel and colleagues reported a positive correlation between initial level of anxiety and ethanol intake using Wistar rats. They tested drug-naïve rats in the elevated plus maze to determine their initial level of anxiety and classified them as anxious or non-anxious. The animals were then subjected to an oral ethanol self-administration procedure. Anxious rats exhibited significantly higher intake and preference for ethanol during the acquisition phase of the voluntary drinking procedure than non-anxious animals. The authors also found that moderate doses of ethanol (i.p.) dose-dependently produced anxiolytic-like effects when tested in the elevated plus maze. The blood ethanol levels following i.p. injections were similar to those reached during the oral ethanol self-administration procedure, suggesting that rats indeed drank sufficient amounts of ethanol to experience its anxiolytic effects. The authors concluded that the basal level of anxiety plays an important role in vulnerability to alcohol drinking in Wistar rats.

Blatt and Takahashi (1999) studied the relationship between anxiety-like behavior and the reinforcing effects of alcohol in a conditioned place preference test using drug-naïve male Wistar rats classified as "anxious" and "non-anxious" in the elevated plus maze. Rats classified as "anxious" showed a significant, though not dose-dependent, preference for all doses of ethanol compared with saline-treated animals. This evidence suggests the relevance of the basal levels of anxiety of rats when trying to detect the reinforcing effects of ethanol.

To test the possibility of a genetic link between behavioral reactivity in anxiety tests and ethanol drinking in animals, some studies have used selective breeding of two contrasting lines/strains that respond differently when exposed to one of several types of stressful stimuli. Vendruscolo and colleagues used an F2 population derived from the inbred Lewis rats and spontaneously hypertensive rats (SHR). They found that *Ofil1* (a locus on rat chromosome 4 named *Ofil1* for open field – OF - inner locomotion, i.e. locomotion in the center of the open field) could contain pleiotropic genes with simultaneous effects on both anxiety-related responses and ethanol drinking (Vendruscolo et al., 2006). Ramos et al. (2003) selected two new rat lines with contrasting scores of central locomotion in the open field, the Floripa H (high anxiety) and Floripa L (low anxiety) rat lines. Floripa L rats tended to display less central open field activity and more anxiety-like behavior in the elevated plus maze and black/white box test compared with their Floripa H counterparts. However, Da Silva et al. (2004) found no relationship between high anxiety and voluntary ethanol intake in the inbred strains Floripa H and Floripa L. Using these same lines, but testing both males and females, Izidio and Ramos (2007) found a positive correlation between ethanol consumption and anxiety only in females. These studies used ethanol consumption paradigms that were different from the present study. They used a short period (8 days) of free-choice responding between water and ethanol (2, 4, 6, and 10%, 2 days for each concentration) after 2 days of forced ethanol (10%). In addition to the short-term ethanol exposure, this procedure only emphasizes ethanol preference, whereas our present model is based on “loss of control” over ethanol intake after a long period of free-choice responding (12 weeks).

The main finding from the present study is that our results are against the hypothesis that high anxiety levels are a determining factor for high ethanol intake, at least in the present experimental paradigm. This result is consistent with some previous studies. Langen and Fink (2004) tested three rat strains (Harlan-Fisher, Wistar-BgVV, and Wistar-Harlan) with different basal anxiety levels in the elevated plus maze in both a free-choice paradigm (0, 5, and 10% ethanol for 12 weeks, 5 days per week; during the first week, 5% sucrose was added to 5 and 10% ethanol solutions) and in an operant lever press paradigm to obtain alcohol. The authors could not find a relationship between anxiety and

ethanol consumption in either of the two paradigms. In another study, Henninger et al. (2002) studied the drinking behavior and sensitivity to the anxiolytic-like effect of alcohol in two rat lines in both males and females that were bred and selected for differences in anxiety-like behavior in the elevated plus maze. The lines included extremely anxious HAB (high anxiety-related behavior) rats and non-anxious LAB (low anxiety-related behavior) rats. They found a negative correlation between anxiety-like behavior and ethanol consumption, measured by free-choice responding for 0, 5, 10, and 20% ethanol for 11 days, followed by 14 days of withdraw and then 3 more days of free-choice. During the first days of voluntary ethanol drinking, ethanol intake and preference of female LAB rats were significantly higher than female HAB rats, results which conflict with Izidio and Ramos (2007). Although not statistically significant, the same trend was seen in male LAB rats. Moreover, male and female LAB, but not HAB, rats exhibited a significant alcohol deprivation effect after abstinence. Furthermore, application of ethanol resulted in an anxiolytic-like effect in HAB, but not LAB, rats in the elevated plus maze. These latter findings are consistent with our data from Experiment 1.

Another approach to testing the possibility of a genetic link between behavioral reactivity in anxiety tests and ethanol drinking in animals is the use of selective breeding of two contrasting lines/strains that respond differently when exposed to ethanol and verifying their response in anxiety tests. Indeed, using selectively bred Sardinian alcohol-preferring (sP) and alcohol non-preferring (sNP) rats, Colombo et al. (1995) reported that sP rats exhibit higher anxiety-like behavior in the elevated plus maze. Similarly, Stewart et al. (1993) showed that selectively bred alcohol-preferring (P) rats had higher anxiety levels than alcohol-nonpreferring (NP) rats. The P rats had greater footshock-induced suppression of operant responding in an approach-avoidance conflict test, spent less time in the open arms of an elevated plus maze, and took longer in a passive avoidance test to step down from a platform to a grid floor where footshock had been received 24 h earlier. Tuominen et al. (1989) reported that rat lines developed by selective outbreeding for differences in their voluntary alcohol consumption (alcohol-accepting [AA] and alcohol-non-accepting [ANA]) showed no clear evidence for differences in anxiety-like behavior in the elevated plus maze. Interestingly, Stewart et al. (1993) showed that moderate doses of



ethanol (i.p.) produced anticonflict or anxiolytic effects in P, but not NP, rats. These latter data are consistent with our results, such that the higher basal anxiety levels correlated with a higher anxiolytic-like effect of ethanol, but with regard to ethanol intake, the results conflict with our data.

An important question to consider is what is selected when performing the selective breeding of two contrasting lines/strains that respond differently when exposed to ethanol or when exposed to an anxiety test. Both phenotypes involve novelty-seeking behavior, exploratory activity, and motility, such that when the selection is made, casual relationships can be inferred. This suggestion raises the discussion proposed by Kushner et al. (2000). They reviewed etiological models of comorbidity, separating them into three categories: anxiety promotes alcoholism, alcoholism promotes anxiety disorders, or comorbid conditions are promoted by a shared third factor.

As seen in the majority of the studies described above, the relationship between anxiety and ethanol intake was based on the preference for ethanol during a short-term period. Previous studies rarely considered compulsive use ("loss of control"), which is a hallmark of addiction. The addiction model used in the present study is based on the persistently high ethanol intake despite the aversive bitter taste of the ethanol solutions, suggesting good face validity for the transition from frequent use to compulsive use. Additionally, the model was shown to have good predictive validity when naltrexone was used (Fachin-Scheit et al., 2006). Indeed, Heyne et al (2000) showed that in some, but not all, rats that were subjected to long-term free-choice responding for alcohol, opiate, or amphetamine, controlled drug consumption switched to compulsive, uncontrollable drug intake. These authors also demonstrated that during the first weeks of drug access, the rat's drug taking was highly variable. We observed a similar phenomenon. During the first 3 to 4 weeks, mice had days of high intake alternated with days of low intake. After 7 weeks of free-choice responding, mice developed a stable pattern of ethanol consumption. Panlilio and Goldberg (2007) highlighted the importance of evaluating drug self-administration in adverse experimental conditions. They observed that when rats were allowed to self-administer cocaine, a small proportion developed behaviors that resembled human addiction. They pointed to an interesting aspect of the behavior exhibited by these rats: the rats' resistance to

punishment (i.e., suppression of behavior by footshock that is delivered only when the rat performs the self-administration response). Thus, the drug-seeking response was less sensitive to the aversive consequences in this subgroup of rats. Another example of continued use despite adverse consequences is that rats given extended access to heroin continue to self-administer the drug even when it induces self-injury behavior (Lenoir and Ahmed, 2007). Another point to consider in the present model is the high amounts of ethanol consumed by “addicted” mice. Heilig and Koob (2007) mentioned that laboratory rodents do not voluntarily consume alcohol to intoxication, partly because of taste aversion, and higher levels of consumption can be achieved by masking the taste of alcohol with a sweetener, which is faded out as alcohol concentrations are increased. However, even using fading procedures, rats that have not been bred for high alcohol preference will rarely consume more than 2 g alcohol/kg/day, and blood alcohol concentrations required for dependence will rarely be achieved (Heilig and Egli, 2006; Egli, 2005). In our model, blood alcohol concentrations were not determined, but the ethanol consumption exhibited by “addicted” mice achieved high mean values of  $9.8 \pm 2.5$  g/kg/day in the AC phase and  $10.4 \pm 2.6$  g/kg/day in the AD phase, while “light-drinker” mice exhibited, respectively,  $5.3 \pm 2.3$  and  $6.5 \pm 2.5$ . Even considering the differences in metabolism among rats, humans, and mice, the consumption levels observed in “addicted” mice are undoubtedly high.

One more consideration refers to the housing conditions of mice during exposure to the addiction model. In Experiments 1 and 2, in which basal anxiety levels were determined, mice were housed 15-20 per cage. In Experiment 3 (i.e., the addiction model), mice were housed individually. This condition could contribute to stress augmentation and may interfere with ethanol intake. McKenzie-Quirk and Miczek (2008) used adult male and female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) and found that acute social separation stress suppresses drinking behavior, while extended separation preferentially increases alcohol intake in a subset of individuals. Ehlers et al. (2007) studied the influence of isolation housing on ethanol intake in P and NP rats. They found that isolation housing increased home cage drinking in both lines and increased limited-access drinking selectively in P rats, but this effect did not correlate with changes in anxiety-like, depressive-like, acoustic startle, or

locomotor behaviors. These findings suggest that social stressors with different time-courses and intensities have opposing effects on alcohol self-administration. Pohorecky (2008) reported that dominant and single-housed rats consumed lower ethanol compared with subdominant and subordinate rats prior to exposure to the elevated plus maze. Furthermore, triad-housed rats, but not single-housed rats, decreased their ethanol intake after being tested on the elevated plus maze. Interestingly, ethanol intake had an anxiolytic-like effect in all rats, but the effect was most prominent in single-housed rats. These data indicate that housing conditions and social rank status influence the emotional state of male rats and that the anxiolytic effect of voluntarily ingested ethanol depends on these variables.

Other stressors can alter ethanol intake. Footshocks increased alcohol consumption in several different lines and strains of non-alcohol-dependent rodents (e.g., unselected Wistar rats, P rats, high-alcohol-drinking [HAD] rats, and Alko alcohol [AA] rats; Vengeliene et al., 2003). However, swim stress increased alcohol consumption only in unselected Wistar rats, not in other strains or lines. Chronic, unpredictable restraint stress actually reduced voluntary alcohol drinking during the application of stress in P rats and HAD1 rats (Chester et al., 2004).

The present study has many limitations, such as the anxiety model used to classify mice. Different anxiety models evaluate different aspects of anxiety. Our laboratory previously demonstrated (Boerngen-Lacerda and Souza-Formigoni, 2000) that the factor analysis performed for the measures obtained in the elevated plus maze and in the open field test in mice indicated that some of these variables did not measure just one, but several components of the animals' behavior. do-Rego et al. (2006) found a positive correlation between %OT in the elevated plus maze and the number of head dips in the hole-board test, suggesting that these tests measure the same feature of anxiety. However, these measures showed weak correlations with measures from the black and white compartment test, suggesting a different component of anxiety. The authors suggested the use of at least two anxiety tests when selecting mice according to their anxiety profile.

Finally, studying addiction in animal models has inherent limitations, mainly because some criteria used to characterize humans as addicted involves subjective descriptions which may be difficult to reproduce in animal models.

## **5. Conclusion**

The present data suggest that, despite the fact that high anxiety trait levels are important for the anxiolytic-like effect of ethanol, they are not a determining factor for high ethanol intake and the development of ethanol addiction, at least in the experimental conditions used in the present study.

## **Acknowledgments**

We thank Silvia N.C. Genaro for technical assistance. The authors also thank the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and the Conselho de Auxilio do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for the fellowships awarded, respectively, to A.F.R. and D.C. The authors also would like to thank Dr Mike Arends for his valuable assistance with manuscript revision.

## **References**

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Press, 1994.

Andreatini R, Bacellar LFS. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2000;24:549-60.

Blatt SL, Takahashi RN. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:457-61.

Bibb JL, Chambless DL. Alcohol use and abuse among diagnosed agoraphobics. *Behav Res Ther* 1986;24:49-58.

Boerngen-Lacerda R, Souza-Formigoni ML. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacol Biochem Behav* 2000;67:225-32.

Breese GR, Overstreet DH, Knapp DJ. Conceptual framework for the etiology of alcoholism: a "kindling"/stress hypothesis. *Psychopharmacology* 2005;178:367-80.

Cappell H, Herman CP. Alcohol and tension reduction: a review. *Q J Stud Alcohol* 1972;33:33-64.

Cornelius JR, Bukstein O, Salloum I, Clark D. Alcohol and psychiatric comorbidity. *Recent Dev Alcohol* 2003;16:361-74.

Chester JA, Blose AM, Zweifel M, Froehlich JC. Effects of stress on alcohol consumption in rats selectively bred for high or low alcohol drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:385-93.

Cloninger CR, Sigvardsson S, Bohman M. Childhood personality predicts alcohol abuse in young adults. *Alcohol Clin Exp Res* 1988;12:494-505.

Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali L, Zocchi A, Fadda F, Gessa GL. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. *Physiol Behav* 1995;57:1181-85.

Conger JJ. Alcoholism: theory, problem and challenge. II. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. *Q J Stud Alcohol* 1956;17:296-305.

Da Silva GE, Ramos A, Takahashi RN. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. *Braz J Biol* 2004;37:1511-17.

Dai X, Thavundayil J, Santella S, Gianoulakis C. Response of the HPA-axis to alcohol and stress as a function of alcohol dependence and family history of alcoholism. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:293-305.

do-Rego JC, Viana AF, Le Maître E, Deniel A, Rates SM, Leroux-Nicollet I, Costentin J. Comparisons between anxiety tests for selection of anxious and non anxious mice. *Behav Brain Res* 2006;169:282-8.

Egli M. Can experimental paradigms and animal models be used to discover clinically effective medications for alcoholism? *Addict Biol* 2005;10:309-19.

Ehlers CL, Walker BM, Pian JP, Roth JL, Slawecki CJ. Increased alcohol drinking in isolate-housed alcohol-preferring rats. *Behav Neurosci* 2007;121:111-9.

Fachin-Scheit DJ, Ribeiro AF, Pigatto G, Goeldner FO, Boerngen-Lacerda R. Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. *J Neural Transm* 2006;113:1305-21.

Fahlke C, Engel JA, Eriksson CPJ, Hard E, Soderpalm B. Involvement of corticosterone in the modulation of ethanol consumption in the rat. *Alcohol* 1994a;3:195-202.

Fahlke C, Hard E, Thomasson R, Engel JA, Hansen S. Metyrapone-induced suppression of corticosterone synthesis reduces ethanol consumption in high-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994b;48:977-81.

Fahlke C, Hard E, Eriksson CPJ, Engel JA, Hansen S. Consequence of long-term exposure to corticosterone or dexamethasone on ethanol consumption in the adrenalectomized rat, and the effect of type I and type II corticosteroid receptor antagonists. *Psychopharmacology* 1995;117:216-24.

Fernandez-Teruel A, Driscoll P, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Escorihuela RM. Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:225-31.

Fox HC, Bergquist KL, Hong KI, Sinha R. Stress-induced and alcohol cue-induced craving in recently abstinent alcohol-dependent individuals. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:395-403.

Goes TC, Antunes FD, Teixeira-Silva F. Trait and state anxiety in animal models: is there correlation? *Neurosci Lett* 2009;450:266-9.

Heilig M, Egli M. Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. *Pharmacol Ther* 2006;111:855-76.

Heilig M, Koob GF. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci* 2007;30:399-406.

Henniger MSH, Spanagel R, Wigger A, Landgraf R, Hölter SM. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:729-36.

Heyman GM. An economic approach to animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health* 2000;24:132-39.

Heyne A, May T, Goll P, Wolffgramm J. Persisting consequences of drug intake: towards a memory of addiction. *J Neural Transm* 2000;107:613-38.



Holmes A, Rodgers RJ. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:473-88.

Izidio GS, Ramos A. Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. *Alcohol* 2007;41:517-24.

Koob GF. Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:232-43.

Kushner MG, Mackenzie TB, Fiszdon J, Valentiner DP, Foa E, Anderson N, Wangenstein D. The effects of alcohol consumption on laboratory-induced panic and state anxiety. *Arch Gen Psychiatry* 1996;53:264-70.

Kushner MG, Abrams K, Borchardt C. The relationship between anxiety disorders and alcohol use disorders: a review of major perspectives and findings. *Clin Psychol Rev* 2000;20:149-71.

Langen B, Fink H. Anxiety as a predictor of alcohol preference in rats? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:961-8.

Lenoir M, Ahmed SH. Heroin-induced reinstatement is specific to compulsive heroin use and dissociable from heroin reward and sensitization. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:616-24.

Marquenie LA, Schadé A, van Balkom AJ, Comijs HC, de Graaf R, Vollebergh W, van Dyck R, van den Brink W. Origin of the comorbidity of anxiety disorders and alcohol dependence: findings of a general population study. *Eur Addict Res* 2007;13:39-49.

McKenzie-Quirk SD, Miczek KA. Social rank and social separation as determinants of alcohol drinking in squirrel monkeys. *Psychopharmacology* 2008;201:137-45.

Merikangas KR, Mehta RL, Molnar BE, Walters EE, Swendsen JD, Aguilar-Gaziola S, Bijl R, Borges G, Caraveo-Anduaga JJ, DeWit DJ, Kolody B, Vega WA, Wittchen HU, Kessler RC. Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: results of the International Consortium in Psychiatric Epidemiology. *Addict Behav* 1998;23:893-907.

Middaugh LD, Favara JP, Boggan WO. Ethanol stimulation after chronic exposure in C57 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 34:331-35.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003;70:83-244.

Möller C, Wiklund L, Sommer W, Thorsell A, Heilig M. Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *Brain Res* 1997;760:94-101.

Noone M, Dua J, Markham R. Stress, cognitive factors, and coping resources as predictors of relapse in alcoholics. *Addict Behav* 1999;24:687-93.

Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 2001;22:502-48.

Panlilio LV, Goldberg SR. Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction* 2007;102:1863-70.

Phillips T. Animal models for the genetic study of human alcohol phenotypes. *Alcohol Res Health* 2002;26:202-7.

Piazza PV, Le Moal M. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol* 1996;36:359-78.

Piazza PV, Marinelli M, Jodogne C, Deroche V, Rouge-Pont F, Maccari S, Le Moal N, Simon H. Inhibition of corticosterone synthesis with metyrapone decreases cocaine-induced locomotion and relapse of cocaine self-administration. *Brain Res* 1994;658:259-64.

Pohorecky LA. Stress and alcohol interaction: an update of human research. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15:438-59.

Pohorecky LA. Psychosocial stress and chronic ethanol ingestion in male rats: effects on elevated plus maze behavior and ultrasonic vocalizations. *Physiol Behav.* 2008;9;94(3):432-47.

Ramos A, Correia EC, Izídio GS, Brüske GR. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behav Genet* 2003;33:657-68.

Sayette M. Does drinking reduce stress? *Alcohol Res Health* 1999;23:250-55.

Schuckit MA, Hesselbrock V. Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship? *Am J Psychiatry* 1994;151:1723-34.

Shippenberg TS, Koob GF. Recent advances in animal models of drug addiction. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. p. 1381-97.

Sinha R, Robinson J, O'Malley S. Stress response dampening: effects of gender and family history of alcoholism and anxiety disorders. *Psychopharmacology* 1998;137:311-20.

Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ. Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:324-31.

Sinha R. The role of stress in addiction relapse. *Curr Psychiatry Rep* 2007;9:388-95.

Sloan TB, Roache JD, Johnson BA. The role of anxiety in predicting drinking behaviour. *Alcohol Alcohol* 2003;38:360-3.

Spanagel R, Montkowski A, Allingham K, Stohr T, Shoaib M, Holsboer F, Landgraf R. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology* 1995;122:369-73.

Spanagel R. Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:507-18.

Stewart RB, Gatto GJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol* 1993;10:1-10.

Tuominen K, Hilakivi LA, Paivarinta P, Korpi ER. Behavior of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rat lines in tests of anxiety and aggression. *Alcohol* 1989;7:349-53.

Vendruscolo LF, Terenina-Rigaldie E, Raba F, Ramos A, Takahashi RN, Mormède P. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on

anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. *Genes Brain Behav* 2006;5:441-50.

Vengeliene V, Siegmund S, Singer MV, Sinclair JD, Li TK, Spanagel R. A comparative study on alcohol-preferring rat lines: effects of deprivation and stress phases on voluntary alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:1048-54.

Viglinskaya IV, Overstreet DH, Kashevskaya OP, Badishtov BA, Kampov-Polevoy AB, Seredenin SB, Halikas JA. To drink or not to drink: tests of anxiety and immobility in alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rat strains. *Physiol Behav* 1995;57:937-41.

Wilson MA, Burghardt PR, Lugo JN Jr, Primeaux SD, Wilson SP. Effect of amygdalar opioids on the anxiolytic properties of ethanol. *Ann N Y Acad Sci* 2003;985:472-5.

Wolffgramm J, Heyne A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Brain Res* 1995;70:77-94.

## 6 CONCLUSÕES

- Com relação ao padrão de ansiedade apresentado no labirinto em cruz elevado foi possível separar os animais em 3 grupos. Esses grupos tiveram diferenças na estabilidade do perfil (apenas animais de média e alta ansiedade tiveram um perfil estável), assim como na resposta ao etanol medida também no labirinto em cruz (apenas animais de alta ansiedade tiveram um efeito ansiolítico persistente).
- No modelo de adição foi possível separar os animais em animais adictos e não adictos, pesados e leves. E esses padrões se distribuíram igualmente entre os animais de alta e média ansiedade.
- Os resultados mostraram a importância de se considerar que quando testamos uma população heterogênea de animais devemos lembrar que existem diferenças individuais tanto basais quanto na resposta ao efeito do etanol.
- O padrão basal de ansiedade dos animais foi importante para o efeito ansiolítico do etanol, porém não influenciou a quantidade e o padrão de consumo de etanol.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AHMED, S. H.; KOOB, G. F. Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. **Science**, v.282, p.298-300, 1998.

AHMED, S. H.; KOOB, G. F. Long lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. **Psychopharmacology**, v.146, p. 303-312, 1999.

AHMED, S. H.; WALKER, J. R.; KOOB, G. F. Persistent increase in the motivation to take heroin in rats with a history of drug escalation. **Neuropsychopharmacology**, v.22, p.413-421, 2000.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia Fundamentos práticos**. Guanabara Koogan, 2006.

ALTSHULER, H. L.; PHILLIPS, P. E.; FEINHANDLER, D. A. Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. **Life Sciences**, v.26, p.679-688, 1980.

**APA - American Psychiatric Association**. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, revised 3rd edition, Washington., DC, pp. 715-718; 1987.



**APA - American Psychiatric Association.** Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th edition. Washington: The American Psychiatry Association; 1994.

BARON, R. M.; KENNY, D. A. The moderator mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic and statistical considerations. **J. Pers. Soc. Psychol.** v.51, p.1173-1182, 1986.

BAU, C. H. D.; SALZANO, F. M. Alcoholism in Brazil - the role of personality and susceptibility to stress. **Addiction**, v.90, n.5, p.693-698, 1995.

BLANE, H. T.; LEONARD, K. E. **Psychological theories of drinking and alcoholism.** New York, Guilford Press, p.55-89, 1987.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M.L.O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.67, n.2, p.225-232, 2000.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. Dissociation de deux composantes dans le comportement d'investigation de la souris. **Arch. Int. Pharmacodyn.** v.147, p.372-387, 1964.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P.; ARON, C. A new method for rapid screening of minor tranquillizers in mice. **European Journal Pharmacology**, v.4, p. 145-151, 1968.

BRANDT, M. R.; FRANCE, C. P. Chronic 1-alpha acetylmethadol in rhesus monkeys: discriminative stimulus and other behavioral measures on dependence and withdrawal. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 287, p. 1029-1037, 1998.

BROWN, J.S.; KALISH, H.I.; FARBER, I.E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. **Behavioral Brain Research**, v.41, p. 317-328, 1951.

CAPPELL, H. An evaluation of tension models of alcohol consumption. In: Gibbins, R.J.; Israel, Y.; Kalant, H.; Popham, R.E.; Schmidt, W. and Smart, R.G. (eds), **Research Advances in Alcohol and Drug Problems**. vol 2, New York: John Wiley, 1975.

CARLEZON, Jr W.A.; DUMAN, R.S.; NESTLER, R.J. The many faces of CREB. **Trends in neurosciences**, v.8, n. 4, p. 436-445, 2005.

CARLINI, E.A.; GALDUROZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; FONSECA, A.M.; CARLINI, C.M.; OLIVEIRA, L.G.; NAPPO, S.A.; MOURA, Y.G.; SANCHEZ, Z.V.D.M. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005**. Supervisão

E.A.Carlini; Coordenação J.C.F. Galduróz; Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

CHILDRRESS, A. R.; MCLELLAN, A. T.; EHRMAN, R.; O'BRIEN, C. P. Classically conditioned responses in opioid and cocaine dependence: A role in relapse? **NIDA Research Monographies**, v. 84, p. 25-43, 1988.

CHOU, I.; NARASIMHAM, K. Neurobiology of addiction. **Nature neuroscience**, v.8, n.11, p. 1427, 2005.

CHRISTMAS, A. J.; MAXWELL, D. R. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats. **Neuropharmacology**, v.9, p.17-29, 1970.

COLOMBO, G. ESBRA-NORDMANN 1996 Award Lecture: Ethanol drinking behavior in Sardinian alcohol-preferring rats. **Alcohol Alcoholism**, v.:32, p. 443-453, 1997.

CONGER JJ. Alcoholism: theory, problem and challenge. II. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol**, v.17, p.296-305, 1956.

COPER, H.; ROMMELSPACHER, H.; WOLFFGRAMM, J. The “point of no return” as a target of experimental research on drug dependence. **Drug and Alcohol Dependency**, v. 25, p. 129-134,1990.

COX, B. J.; SWINSON, R. P.; DIREFELD, D. M. BOURDEAU, D. Social desirability and self-reports of alcohol abuse in anxiety disorder patients.

**Behav. Res. Ther.**, v. 32, n.1, p. 175-178, 1994.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: Interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, p. 1670-1672, 1999.

CRAWLEY, J. N.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.13, p. 167-170,1980.

CUNHA, J. M.; MASUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacology**. v.16, p. 259-267,1978.

CUNNINGHAM, C. L.; FIDLER, T. L.; HILL, K. G. Animal models of alcohol's motivational effects. **Alcohol Research and Health**, v. 24, p. 85-92, 2000.

DEANGELIS, L.; FILE, S. E. Acute and chronic effects of three benzodiazepines in the social interaction anxiety test in mice. **Psychopharmacology. (Berlin)**, v. 64, p. 127-129, 1979.

DEL PORTO, J. A.; MASUR, J. The effects of alcohol , THC and diazepam in two different social settings. A study with human volunteers. **Res. Comm. Psychol. Psych. Behav.** v.9, n. 2, p. 201-212, 1984.

DEPUE, R.A.; COLLINS, P.F. Neurobiology of the structure of personality: dopamine, facilitation of incentive motivation, and extraversion. **Behavioral Brain Sciences**, v.22, n.3, p.491-517, 1999.

EDWARDS, G. J. Motivation for drinking among men: Survey of a London suburb. **Psychol. Med.** v.2, p. 260-271, 1972.

EISENDRATH, S. J.; BROPHY, J. J. Psychiatric disorders. In: Tierney, L. M.; Mcphee, S. J. and Papadakis, M. A. (eds.), **Current Medical diagnosis and treatment**. Connecticut: Appleton and Lange Press , pp 905-906, 1995.

EMMETT-OGLESBY, M. W.; MATHIS, D. A.; MOON, R. T.; LAL, H. Animal models of drug withdrawal symptoms. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 292-309, 1990.

FACHIN-SCHUIT D.;J.; FROZINO RIBEIRO A.; PIGATTO G.; GOELDNER O.; BOERNGEN-LACERDA R. Development of a mouse model of ethanol addiction:naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. **Journal Neural Transmition**, v.113, p. 1305–1321, 2006.

FARBER, P. D.; KHAVARI, K. A. and DOUGLASS, F. M. A factor analytic study of reasons for drinking: empirical validation of positive and negative reinforcement dimensions. **J. Consult. Clin. Psychol.** v.48, n.6, p. 780-781, 1980.

FILE, S. E. A comparison of the effects of ethanol and chlordiazepoxide on exploration and on its habituation. **Physiol. Psychol.** v.4, p. 529-532, 1976.

FILE, S. E. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. **Journal of Neurosciences Methods**, v.2, n. 219-238, 1980.

FILE, S. E.; MALBUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterization of the phenomenon of "one trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.102, p. 98-101, 1990.

FILLMORE, M. T.; VOGELSPROTT, M. Expectancies about alcohol-induced motor impairment predict individual differences in response to alcohol and placebo. **Journal of Studies on Alcohol**, v.56, p. 90-98, 1995.

FREUD, S. (1894) The justification for detachment from neurasthenia of a particular syndrome the anxiety neurosis. In: **Collective Papers** (transl J. Strachey), London: Hogarth Press, pp 76-106, 1924.

GILPIN, N.W.; KOOB, G.F. Neurobiology of alcohol dependence. **Alcohol research and health**, v.31, n.3, p. 185-195, 2008.

GOODWIN RD, FERGUSON DM, HORWOOD LJ. Association between anxiety disorders and substance use disorders among young persons: results of

a 21-year longitudinal study. **Journal of Psychiatric Research**, v.38, n.3, p.295-304, 2004.

GOLDMAN, M.; BROWN, S.; CHRISTIANSEN, B. (1987). Expectancy theory-thinking about drinking. In: Blane, H.T. and Leonard, K.E. (eds). *Psychological Theories of Drinking and Alcoholism*. New York: Guilford.

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety**. Oxford university press, 2 ed, 2000.

GROVE, W. M.; ECKERT, E. D.; HESTON, L.; BOUCHARD, T. J.; SEGAL, N. LYKKEN, D. T. Heritability of substance abuse and antisocial behavior: a study of monozygotic twins reared apart. **Biological Psychiatry** v.27, p. 1293-1304, 1990.

HAGNELL, O.; LANKE, J.; RORSMAN, B. OHMAN, R. Predictors of alcoholism in the Lundby Study II: personality traits as risk factors for alcoholism. **Eur. Arch. Psych. Clin. Neurol. Sci.** v.235, p. 192-196, 1986.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I Defaecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. comp. Psychol.** .v.18, p.385-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MCBLANE, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.** v.29, p. 129-138, 1993.

HECKER, E. Über larvirte und abortive angstzustände bei neurasthenie. *Zentralbl. Nervenheilk.* (Berlin) v.133, p. 565-572, 1893.

HELZER, J.; PRYZBECK, T. The co-occurrence of alcoholism with other psychiatric disorders in the general population. **Journal of Studies on Alcohol** v.49, p. 219-224, 1988.

HESSELBROCK, M. N.; MEYER, R. E.; KEENER, J. J. Psychopathology in hospitalized alcoholics. **Arch. Gen. Psychiatry** .v.42, p. 1050-1055, 1985.

HEYMAN, G. M. An Economic approach to animal models of alcoholism. **Alcohol Research and Heatth**, v. 24, (Suppl. 2), p. 132-140, 2000.

HILL, S. Y.; ZUBIN, J.; STEINHAUER, S. R. Personality resemblance in relatives of male alcoholics: a comparison with families of male control cases. **Biological Psychiatry**, v.27, p. 1305-1322, 1990.

JENTSCH, J. D.; JENTSCH, J. D.; HENRY, P. J.; MASON, P. A.; MERRITT, J. H.; ZIRIAX, J. M. Establishing orally self-administered cocaine as a reinforcer in rats using home-cage pre-exposure. **Progress in**



**Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 22, p. 229-239, 1998.

KALODNER, C. R.; DELUCIA, J. L.; URSPRUNG, A. W. An examination of the tension reduction hypothesis: the relationship between anxiety and alcohol in college students. **Addictive Behavior**, v.14, n.6, p. 649-654, 1989.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J. Classificação na Psiquiatria. In: Kaplan, H. I.; Sadock, B. J. and Freedman, A.M. (eds.), **Compêndio de Psiquiatria Dinâmica**. Porto Alegre: Artes Médicas Editora, pp 227, 1984.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. S. **Comprehensive textbook of psychiatry**. Williams e Wilkins, 1995.

KOOB, G.F.; SANNA, P.P.; BLOOM, F.E. Neuroscience of addiction. **Neuron**, v. 21, p. 467-476, 1998.

KOOB, G. F. Animal models of craving for ethanol. **Addiction**, v. 95 (Suppl. 2), p. 73-81, 2000.

KOOB, G.F. Alcoholism: allostasis and beyond. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v.71, n.2, p. 232-243, 2003.

KOOB, G.F.; Le MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annual review of psychology**, v.59, p. 29-53, 2008.

LANGERBUCHER, J. (1985). The causes and consequences of alcoholic drinking: the role of affect. Unpublished dissertation. Rutgers University.

LEWIS, C. E. and BUCHOLZ, K.K. Alcoholism, antisocial behavior and family history. **Br. J. Addict.** v.86, p.177-194, 1991.

LISKOW, B.; POWELL, B. J.; NICKEL, E. and PENICK, E. Antisocial alcoholics: are there clinically significant diagnostic subtypes? **Journal of Studies on Alcohol**, v.52, p.62-69, 1991.

LI, T. K. Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking. **Journal of Studies in Alcohol**, v. 61, p. 5-12, 2000.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, p.180-185, 1987.

LISTER, R. G. Ethologically based animals models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther.** V.46, p. 321-340, 1990.

LOVINGER, D.M. Communication networks in the brain. **Alcohol research and health**, v.31, n.3, p. 196-214, 2008.

MALLOY, P.; NOEL, N.; ROGERS, S.; LONGABAUGH, R.; BEATTIE, M. Risk factors for neuropsychological impairment in alcoholics: antisocial personality,

age, years of drinking and gender. **Journal of Studies on Alcohol**, v.50, p.422-426, 1989.

MARLATT, G. A. Alcohol use and problem drinking: A cognitive behavioral analysis. In: Kendall, PC, Hollon, SP (eds), **Cognitive behavioral interventions: Theory, research and procedures**. New York: Academic Press, pp 319-355, 1979.

MASSION, A. O.; WARSHAW, M. G.; KELLER, M. B. Quality of life and psychiatric morbidity in panic disorder and generalized anxiety disorder. **American Journal Psychiatry**, .v.150, p. 600-607, 1993.

MCBLANE, J. W. and HANDLEY, S. L. **An approach to the assessment of anxiety using the elevated X-maze**. J. Psychopharm. Abstr. Book A9, 36, 1992.

MCCLUNG, C.A.; ULERY, P.G.; PERROTTI, L.I.; ZACHARIOU, V.; BERTON, O.; NESTLER, E.J.  $\Delta$ fos-B: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. **Molecular brain research**, v. 132, p. 146-154, 2004.

MCNAUGHTON, N.; GRAY, J.A. Anxiolytic action on the behavioral inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of affective disorders**, v.61, p. 161-176, 2000.

MCNAUGHTON, N; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and behavioral reviews**, v. 28, p. 285-305, 2004.

McFARLAND, K.; ETTENBERG, A. Reinstatement of drug-seeking behavior produced by heroin-predictive environmental stimuli. **Psychopharmacology**, v.131, p.86-92, 1997.

MEISCH, R. A. Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. **Alcohol**, v.24, p.117-128, 2001.

MILLIAN M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in neurobiology**, v. 70, p. 83-244, 2003.

MISSLIN, R.; ROPARTZ, P. MANDEL, P. Étude comparée du di-n-propylacétate et de l'oxazepam sur l'activité spontanée de la souris. C. R. Acad. Sci. III 281: 1175-1178, 1975.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **J. comp. Physiol Psychol.** v.48, p. 254-260, 1955.

MORRIS, E.P.; STEWART, S.H.; HAM, L.S. The relationship between social anxiety disorder and alcohol use disorders: a critical review. **Clinical psychology review**, v.25, p. 734-760, 2005.

NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism (Review). **Neurochemistry International**, v.26, n.4, p. 305-336, 1995.

NESTLER, E. J.; Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature neuroscience**, v.8, n.11, p. 1445 – 1449, 2005.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; SELF, D.W.  $\Delta$ fosB: a sustained molecular switch for addiction. **PNAS**. V. 98, n. 20, 2001.

NOLAN, N. A.; PARKES, M. W. The effects of benzodiazepines on the behavior of mice on a hole board. **Psychopharmacology**, v.29, p. 277-288, 1973.

NOYES JR., R.; WOODMAN, C.; GARVEY, M.J.; COOK, B. L.; SUELZER, M. and ANDERSON, D. J. Generalized anxiety disorder versus panic disorder: distinguishing characteristics and patterns of comorbidity. **J. Nerv. Ment. Dis.** v. 180, p. 369-379, 1992.

O'BRIEN, C. P.; CHILDRESS, A. R.; MCLELLAN, A. T.; EHRMAN R. Classical conditioning in drug-dependent humans. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.654, p.400-415, 1992.

PANLILIO, L. V.; GOLDBERG, S. R. Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. **Addiction**, v. 102, p. 1863-1870, 2007.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. and BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.

**Journal of Neurosciences Methods**, v.14, p. 149-167, 1985.

PHILLIPS, T. Animal models for the genetic study of human alcohol phenotypes. **Alcohol Research and Health**, v. 26, p. 202-207, 2002.

ROBERTS, A. J.; HEYSER, C. J.; COLE, M.; GRIFFIN, P.; KOOB, G. F. Excessive ethanol drinking following a history of dependence: animal model of allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, p.581-594, 2000.

ROBINSON, J.; SAREEN, J.; COX, B.J.; BOLTON, J. Self-medication of anxiety disorders with alcohol and drugs: results from a nationally representative sample. **Journal of anxiety disorders**, v.23, n.1, p. 38-45, 2009.

RODGERS, R. J.; LEE, C. and SHEPHERD, J. K. Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. **Psychopharmacology**, v. 106, p. 102-110, 1992.

SCHMIDT, N.B.; BUCKNER, J.D.; KEOUGH, M.E. Anxiety sensitivity as a prospective predictor of alcohol use disorders. **Behavior Modification**, v.31, n. 2, p. 202-219, 2007.

SCHUCKIT, M.A.; HESSELBROCK, V. Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship? **American Journal Psychiatry**, v. 151, p. 1723-1734, 1994.

SEE, R. E.; GRIMM, J. W.; KRIZICH, P. J.; RUSTAY, N. The importance of a compound stimulus in conditioned drug-seeking behavior following one week of extinction from self-administered cocaine in rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 57, p. 41-49, 1999.

SCHUCKIT, M.A. Comorbidity between substance use disorders and psychiatric conditions. **Addiction**, v. 101, p. 76-88, 2006.

SHAHAM, Y.; HOPE, B. T. The role of neuroadaptations in relapse to drug seeking. **Nature neuroscience**, v.8, n.11, p. 1437 – 1439, 2005.

SHIPPENBERG, T. S.; KOOB, G. F. Recent advances in animal models of drug addiction. In: Kenneth, L.; Davis et al., (eds) **Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacol**, p.1381-1397, 2002.

SMAIL, P.; STOCKWELL, T.; CANTER, S. and HODGSON, R. Alcohol dependence and phobic anxiety states. I. A prevalence study. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v.144, p. 53-57, 1984.

SILVEIRA, D.X.; MOREIRA, F.G. **Panorama atual de drogas e dependências**. Atheneu, 2006.

SOLOMON, P.; PATCH, V. D. (1975). **Manual de Psiquiatria**. Solomon, P.; Patch, V. D. (eds.), Azzi, E.; Pratarotti, A.R. (trad.), São Paulo: Atheneu Ed. Universidade de São Paulo.

SIMIAND, J.; KEANE, P. E.; MORRE, M. The staircase test in mice: a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. **Psychopharmacology**, v.84, p. 48-53, 1984.

SOUBRIE, P.; KULKARNI, S.; SIMON, P. and BOISSIER, J. R. Effets de anxiolytiques sur la prise de nourriture de rats et de souris places en situation nouvelle ou familiere. **Psychopharmacology**, v.45, p. 203-310, 1975.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Research and Health**, v.24,n. 2, p. 124-131, 2000.

SPANAGEL, R. Alcohol addiction research: from animal models to clinics. Best Practice, **Research in Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 507-518, 2003.

SPANAGEL, R.; HÖLTER, S. M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. **Journal of Neural Transmission**, v.107, p. 669 –680, 2000.



STABENAU, J. R. Implications of family history of alcoholism, antisocial personality and sex differences in alcohol dependence. **American Journal Psychiatry**, v. 141, p. 1178-1182, 1984.

STARCEVIC, V.; UHLENHUTH, E. H.; KELLNER, R. and PATHA, K. D. Patterns of comorbidity in panic disorder and agoraphobia. **Psych. Res.** v.42, p.171-183, 1992.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, H. L. Animal models in alcohol research. **Alcohol Research and Health**, v.24, p.77-84, 2000.

TARTER, R.; KABENE, M.; ESCALLIER, E.; LAIRD, B. and JACOB, T. Temperament deviation and the risk for alcoholism. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.14, p. 380-382, 1990.

TERRA, M.B.; BARROS, H.M.; STEIN, A.T.; FIGUEIRA, I.; JORGE, M.R.; PALERMO, L.H.; ATHAYDE, L.D.; GONÇALVES, M.S.; SPANEMBERG, L.; POSSA, M.A.; DARUY FILHO, L.; DA SILVEIRA, D.X. Social anxiety disorder in 300 patients hospitalized for alcoholism in Brazil: high prevalence and undertreatment. **Comprehensive Psychiatry**. V. 47, n.6, p.463-467, 2006.

THIEBOT, M. H.; SOUBRIE, P.; SIMON, P. and BOISSIER, J. R. Dissociation de deux composantes du comportement chez le rat sous l'étude des anxiolytiques. **Psychopharmacology**, v. 31, p.77-90, 1973.

THYER, B. A.; PARRISH, R. T.; HIMLE, J.; CAMERON, O.G.; CURTIS, G. C. and NESSE, R. M. Alcohol abuse among clinically anxious patients. *Behav. Res. Ther.* V.24, p.357-359, 1986.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.44, p. 463-469, 1993.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Special report to the US Congress on Alcohol and Health**. 10 ed., United States: National Institutes of Health 2000; 78-133.

VAILLANT, G. E. Natural history of male alcoholism, V: is alcoholism the cart or the horse to sociopathy? **Brazilian Journal of Addiction**, v.78, p.317-326, 1983.

VALZELLI, L. Activity of benzodiazepines on aggressive behavior in rats and mice. In: Garattini, S.; Mussini, E. and Randall, L.O. (eds), *The Benzodiazepines*, New York: Raven Press, pp 405-417, 1973.

VOGEI, J.R.; BEER, B.; CLODY, D.E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacology**, v.21, p. 1-7, 1971.

VOLKOW, N.; LI, T. The neuroscience of addiction. **Nature neuroscience**, v.8, n.11, p. 1429 – 1430, 2005.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open field test: a critical review. **Psychol. Bull.** V.83, p. 482-504, 1976.

WALKER, E. L. (1969). A natureza do reforçamento. In: Ades, C. (trad.), *Aprendizagem: o condicionamento e a aprendizagem instrumental*. São Paulo: Editora Herder, pp 131.

WARREN, K.R.; FLOUDIN, L.L. Alcohol-related birth defects – the past, present and future. **Alcohol Research and health**, v.25, n.3, 2001.

WEISS, F. Neuroadaptive changes in neurotransmitter systems mediating ethanol-induced behaviors. **Review of NIAAA's Neurosci Beh Res Portfolio**; v.34, p. 261-314, 2000.

WEISSMAN, M. Anxiety and alcoholism. **Journal of Clinical Psychiatry**, p.17-19, 1988.

WHIPPLE, S.; PARKER, E. NOBLE, E. Personality characteristics of alcoholic fathers and their sons. **Journal of Studies on Alcohol**, v.52p, 331-337, 1991.

WILSON, G. T.; PEROLD, E. A.; ABRAMS, D. B. The effects of expectations of self-intoxication and partner's drinking on anxiety in dyadic social interaction. **Cog. Ther. Res.** v.5, p.251-264, 1981.

WOLFFGRAMM, J. Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 233-239, 1990.

WOLFFGRAMM, J.; HEYNE, A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. **Review of Behavioural Brain Research**, v.70, p. 77-94, 1995.

WOLFFGRAMM, J. et al. Animal models of addiction: models for therapeutic strategies? **Journal of Neural Transmission**, v,107, p. 649-668, 2000.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). The **World Health Report 2002**. Reducing Risks, promoting healthy life. WHO. Geneva, 2002.

ZIMMERMANN, G.; PIN, M.A.; KRENZ, S.; BOUCHAT, A.; FAVRAT, B.; BESSON, J.; ZULLINO, D.F. Prevalence of social phobia in a clinical sample of drug dependent patients. **Journal of affective disorders**, v. 83, p. 83-87, 2004.

## APÊNDICE 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

TABELA 1 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO LEVE

AC					RE	AD	ANOVA	
Na	Pref	M (g/kg) ± SE	T	P	M (g/kg) ± SE	M (g/kg) ± SE	F(2,41)	P
11 MA	A	7,36 ± 0,52	3,462	0,001	5,27 ± 0,59	8,08 ± 0,63 a b	5,965	0,005
13 HA	A	8,19 ± 0,37 c	3,054	0,005	5,28 ± 0,41 a c	6,81 ± 0,45	13,80	0,000
14 HA	A	6,07 ± 0,74	6,023	0,000	3,21 ± 0,84 a	5,51 ± 0,91	3,450	0,041
29 HA	A	7,96 ± 0,71	4,358	0,000	8,83 ± 0,80	9,58 ± 0,87	1,077	0,349
31 HA	A	3,75 ± 0,39	8,542	0,000	3,43 ± 0,44	3,07 ± 0,48	0,599	0,553
32 HA	A	4,99 ± 0,42	6,439	0,000	5,91 ± 0,47	7,31 ± 0,51 a	6,172	0,0045
35 MA	A	2,91 ± 0,39	8,441	0,000	4,95 ± 0,44 a	5,76 ± 0,48 a	11,88	0,000
38 HA	A	4,19 ± 0,50	4,263	0,000	5,25 ± 0,57	4,64 ± 0,62	0,9680	0,388
43 MA	A	1,87 ± 0,37	10,346	0,000	2,48 ± 0,4	2,20 ± 0,45	0,6022	0,552
44 MA	A	8,95 ± 0,96	4,747	0,000	6,33 ± 1,09	6,04 ± 1,18	2,425	0,100
45 MA	A	2,34 ± 0,34	7,280	0,000	3,06 ± 0,38	3,01 ± 0,42	1,223	0,304
51 HA	A	5,26 ± 0,58	5,894	0,000	6,23 ± 0,65	7,46 ± 0,71	2,926	0,064
52 HA	A	6,31 ± 0,51	12,770	0,000	7,84 ± 0,58	10,4 ± 9,10	12,47	0,000
55 MA	A	5,51 ± 0,62	3,808	0,000	7,23 ± 0,70	7,41 ± 0,76	2,504	0,094
69 MA	A	6,20 ± 0,67	12,880	0,000	7,37 ± 0,76	9,29 ± 0,83 a	4,200	0,021
71 MA	A	3,07 ± 0,45	7,979	0,000	4,59 ± 0,51	5,80 ± 0,55 a	7,555	0,001

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação).. A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. a- diferente da fase de livre escolha; b- diferente da fase de reapresentação ( $p \leq 0,05$  pelo menos, Newman-Keuls). Na- número do animal. HA alta ansiedade, MA ansiedade média.

TABELA 2 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO ADICTO

AC					RE	AD	ANOVA	
Na	Pref	M (g/kg) $\pm$ SE	T	P	M (g/kg) $\pm$ SE	M (g/kg) $\pm$ SE	F(2,41)	P
5 MA	E	14,47 $\pm$ 0,77	-5,738	0,000	11,1 $\pm$ 0,88 a b	13,7 $\pm$ 0,95	4,140	0,023
7 MA	E	9,69 $\pm$ 0,54	-3,000	0,005	6,95 $\pm$ 0,61 a b	9,84 $\pm$ 0,66	7,059	0,002
8 MA	S	8,88 $\pm$ 0,82	-1,882	0,068	7,63 $\pm$ 0,93	10,9 $\pm$ 1,01	2,899	0,066
10 MA	E	11,9 $\pm$ 0,79	-3,852	0,000	7,87 $\pm$ 0,89	11,4 $\pm$ 0,97	6,568	0,003
21 HA	S	7,17 $\pm$ 0,72 c	0,083	0,934	11,7 $\pm$ 0,81 a c	14,7 $\pm$ 0,88	23,385	0,000
22 HA	E	10,1 $\pm$ 0,55	-10,949	0,000	10,1 $\pm$ 0,62	11,6 $\pm$ 0,67	1,905	0,161
23 HA	S	6,00 $\pm$ 0,60	1,225	0,229	10,5 $\pm$ 0,68 a	11,7 $\pm$ 0,73 a	21,906	0,000
25 MA	E	10,7 $\pm$ 0,76	-6,694	0,000	8,39 $\pm$ 0,86	8,76 $\pm$ 0,93	2,393	0,103
27 MA	E	10,8 $\pm$ 0,45	-18,671	0,000	10,8 $\pm$ 0,51	10,53 $\pm$ 0,55	0,085	0,918
39 HA	E	12,5 $\pm$ 0,51	-16,027	0,000	8,32 $\pm$ 0,57	10,5 $\pm$ 0,62	15,078	0,000
41 MA	E	9,89 $\pm$ 0,80	-3,430	0,001	7,54 $\pm$ 0,90	10,2 $\pm$ 0,97	2,628	0,082
46 HA	E	9,78 $\pm$ 0,59	-14,120	0,000	7,96 $\pm$ 0,67	9,35 $\pm$ 0,73	2,136	0,131
47 HA	E	11,3 $\pm$ 1,05	-3,337	0,002	9,57 $\pm$ 1,19	13,2 $\pm$ 1,28	2,250	0,118
53 MA	S	7,35 $\pm$ 0,93	-0,063	0,949	10,51 $\pm$ 1,05	14,3 $\pm$ 1,14	11,096	0,000
56 MA	E	12,9 $\pm$ 0,61	-18,073	0,000	10,9 $\pm$ 0,69	12,1 $\pm$ 0,75	2,299	0,113
62 MA	S	7,76 $\pm$ 0,72	0,960	0,343	5,84 $\pm$ 0,82	8,23 $\pm$ 0,89	2,327	0,110
64 MA	E	13,4 $\pm$ 1,16	-3,663	0,001	11,1 $\pm$ 1,31	11,7 $\pm$ 1,42	0,956	0,392
65 HA	S	9,06 $\pm$ 0,72	1,3148	0,197	5,78 $\pm$ 0,82 a	8,00 $\pm$ 0,89	4,525	0,016
72 MA	E	5,32 $\pm$ 0,59	-2,274	0,029	3,58 $\pm$ 0,67	4,65 $\pm$ 0,73	1,863	0,168
73 MA	S	5,35 $\pm$ 0,48	-0,7436	0,462	4,43 $\pm$ 0,54 c	6,77 $\pm$ 0,58	4,283	0,020
76 HA	E	8,26 $\pm$ 0,51	-6,940	0,000	6,10 $\pm$ 0,58 a	6,68 $\pm$ 0,63	4,276	0,020
77	E	7,54 $\pm$ 0,57	-7,529	0,000	8,54 $\pm$ 0,65	7,07 $\pm$ 0,70	1,268	0,292

<b>HA</b>								
<b>78 HA</b>	E	10,2 ± 0,51	-12,970	0,000	9,67 ± 0,58	8,63 ± 0,63	1,962	0,153

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação).. A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. a- diferente da fase de livre escolha; b- diferente da fase de reapresentação ( $p \leq 0,05$  pelo menos, Newman-Keuls). Na- número do animal. HA alta ansiedade, MA ansiedade média.

**TABELA 3 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO PESADO**

AC					RE	AD	ANOVA	
Na	Pref	M (g/kg) ± SE	T	P	M (g/kg) ± SE	M (g/kg) ± SE	F(2,41)	P
<b>9 MA</b>	E	15,9 ± 0,80	-5,934	0,000	6,45 ± 0,92 a	5,94 ± 0,99 a	43,111	0,000
<b>15 MA</b>	E	12,8 ± 1,15	-2,400	0,022	8,81 ± 1,30	7,81 ± 1,40 a	4,561	0,016
<b>17 HA</b>	S	12,3 ± 1,41	-1,811	0,079	6,63 ± 1,60 a	7,66 ± 1,73 a	4,036	0,025
<b>36 MA</b>	E	17,6 ± 0,70	-19,431	0,000	10,0 ± 0,80 a	9,64 ± 0,86 a	35,730	0,000
<b>48 HA</b>	E	12,5 ± 0,51 c	-21,370	0,000	7,98 ± 0,58 a c	10,2 ± 0,63	16,727	0,000
<b>59 HA</b>	E	13,8 ± 0,72	-6,490	0,000	8,50 ± 0,81 a	8,53 ± 0,88 a	16,708	0,000
<b>60 MA</b>	E	15,3 ± 0,81	-7,938	0,000	10,0 ± 0,93 a	10,1 ± 1,00 a	12,331	0,000
<b>63 MA</b>	E	10,3 ± 0,82	-7,553	0,000	6,39 ± 0,94 a	6,78 ± 1,01 a	6,116	0,004
<b>66 HA</b>	E	17,6 ± 1,14	-8,974	0,000	11,1 ± 1,29 a	13,8 ± 1,39 a	7,226	0,002
<b>68 HA</b>	S	13,2 ± 1,12	-1,117	0,271	7,44 ± 1,26 a	8,62 ± 1,36 a	6,577	0,003
<b>74 MA</b>	E	7,03 ± 0,38	-4,558	0,000	5,43 ± 0,43 a	4,85 ± 0,46 a	7,472	0,001
<b>79 HA</b>	E	14,4 ± 0,65	-15,482	0,000	8,80 ± 0,74	11,2 ± 0,80	16,041	0,000
<b>80 MA</b>	E	13,9 ± 0,58	-18,043	0,000	9,95 ± 0,66	9,43 ± 0,71	15,553	0,000

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média  $\pm$  erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação).. A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. a- diferente da fase de livre escolha; b- diferente da fase de reapresentação ( $p \leq 0,05$  pelo menos, Newman-Keuls). Na - número do animal. HA alta ansiedade, MA ansiedade média.



## Apêndice 2 – Avaliação comportamental

Situação	Primeiro teste basal								Segundo teste basal								5 horas de abstinência							
Consumo	Adicto		Pesado		Leve		Controle		Adicto		Pesado		Leve		Controle		Adicto		Pesado		Leve		Controle	
Ansiedade	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA	HA	NA
Ambulação campo aberto	124		130		126		117		86,0		99,0		69,0		86,0		110		126		89,0		106	
	150		155		146		135 2		111		133		102		118		126		157		108		132	
	2		2		2 ab		159		ab		ab		124		ab		155		200		159		182	
	164		185		177				135		148				161									
25 quartil <i>Mediana</i> 75 quartil	126	124	130	130	124	132	118	116	63,0	100	81,0	117	74,0	69,0	64,0	88,0	110	125	93,0	138	80,5	101	107	106
	152	138	155	165	160	145	150	128	91,0	120	120	141	118	97,5	154	114	111	133	143	192	101	118	172	129
	2ab	162	2	223	178	168	159	159	ab	136	137	ab	139	112	166	123	155	155	176	204	135	168	212	151
	166		185						122			150												

**Ambulação no campo aberto nas três ocasiões de teste.** 2 - diferente do segundo teste para mesmo grupo, Ab - diferente do teste da abs para mesmo grupo. ANOVA de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas. ANOVA de Friedman seguida por wilcoxon.

Situação	Primeiro teste basal								Segundo teste basal								5 horas de abstinência							
Consumo	Adicto		Pesado		Leve		Controle		Adicto		Pesado		Leve		Controle		Adicto		Pesado		Leve		Controle	
Ansiedad e	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA
<b>Total entradas</b>	16,5		17,0		16,5		15,0		12,0		14,0		12,0		13,0		7,00		11,0		5,50		6,00	
	19,5		20,0		18,5		17,0		14,0		16,0		14,5		15,5		11,5		14,0		11,5		10,5	
	2 ab		ab		2 ab		ab		ab		22,0		ab		ab		15,0		20,0		19,0		13,0	
	22,0		22,0		21,0		22,0		17,5				19,0		18,5									
<b>LCE</b>	17,0	20,0	20,0	21,0	18,5	19,0	17,0	17,0	14,0	15,0	15,0	19,0	17,0	20,0	20,0	21,0	18,5	19,0	17,0	17,0	14,0	15,0	15,0	19,0
<b>25 quartil</b>	14,0	18,0	15,0	18,0	14,0	17,0	15,0	15,0	9,0	14,0	13,0	16,0	14,0	18,0	15,0	18,0	14,0	17,0	15,0	15,0	9,0	14,0	13,0	16,0
<b>Mediana</b>	2	sb	ab	ab	ab	ab	2	ab	cm	ab	18,0	24,0	21,0	22,0	ab	ab	20,0	23,0	24,0	cha	15,0	27,0	18,0	24,0
<b>75 quartil</b>	21,0	22,0	22,0	23,0	20,0	23,0	24,0	20,0	15,0	27,0					22,0	23,0			20,0					

**Total de entradas no labirinto em cruz elevado nas três ocasiões de teste** , Cma – difere do grupo controle media ansiedad na mesma ocasião de testem, Cha – difere do grupo controle alta ansiedad na mesma ocasião de teste, 2 - difere do segundo teste para o mesmo grupo, Ab - difere da teste da abstinência para o mesmo grupo. ANOVA de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas. ANOVA de Friedman seguida por wilcoxon.

Situação	Segundo teste basal								5 horas de abstinência							
Consumo	Adicto		Pesado		Leve		Controle		Adicto		Pesado		Leve		Controle	
Ansiedade	HA	MA	HA	MA	HA	MA	HA	MA	HA	MA	HA	MA	HA	MA	HA	MA
<b>Ambulação</b>	57,5		63,0		70,5		62,0		88,5		101		104		104	
	47,5		60,0		55,5		54,0		70,0		96,0		88,0		76,5	
	ab		ab		ab		ab		109,5		117		126		134	
	67,0		84,0		80,5		77,0									
<b>CME</b>	42,0	50,0	63,0	69,5	69,0	83,0	100	113	69,0	83,0	100	113	80,5	101	107	106
<b>25 quartil</b>	68,0	56,0	60,0	48,0	94,0	71,0	91,0	96,0	94,0	71,0	91,0	96,0	101	118	172	129
<b>Mediana</b>	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	115	102	142	117	135	168	212	151
<b>75 quartil</b>	59,0	65,0	84,0	90,0	115	102	142	117								

**Ambulação na caixa de movimentação espontânea nos segundo teste basal e no teste da abstinência.** ANOVA de Kruskal-Wallis. Teste de Wilcoxon.  
 Ab – diferente do teste da abstinência para o mesmo grupo.